

GABRIEL OTTO MEISSNER

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE TOXINA PERTENCENTE À FAMÍLIA DAS
NOTINAS PRESENTE NO VENENO DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles*
intermedia)

CURITIBA 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

GABRIEL OTTO MEISSNER

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE TOXINA PERTENCENTE À FAMÍLIA DAS
NOTINAS PRESENTE NO VENENO DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles
intermedia*)

Dissertação apresentada como requisito parcial a
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e
Molecular, Programa de Pós-Graduação do
Departamento de Biologia Celular, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Meiri Chaim

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA 2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

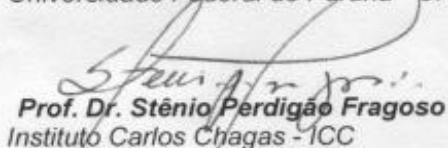
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

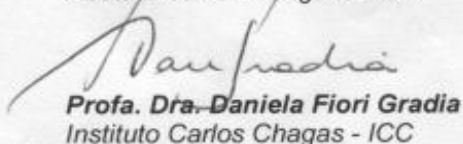
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Instituto Carlos Chagas - ICC



Profa. Dra. Daniela Fiori Gradia
Instituto Carlos Chagas - ICC

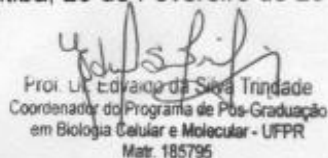
E tendo como suplente,

Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando **Gabriel Otto Meissner**, em relação ao seu trabalho intitulado: "**Clonagem e expressão de toxina pertencente à família das notinas presentes no veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermédia*)**", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Fevereiro de 2012



Profa. Dra. Edvânia da Silva Trindade
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Olga Meiri Chaim por estar sempre ao lado de todos no laboratório, por estar presente na minha vida científica desde o começo. Pela motivação, incentivo e conselhos que me ajudaram muito ao longo desse processo.

Ao grande Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga por ter construído um fantástico grupo de pesquisa que me inspira a continuar na carreira acadêmica e por todo conhecimento recebido ao longo desses anos.

A Prof^a. Andrea Senff Ribeiro por ter sido a minha primeira orientadora de iniciação científica na Biologia Celular.

A minha eterna mestra e amiga Dilza Trevisan Silva que guiou meus primeiros passos no laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos. Por ter me ensinado como devem ser feitas as coisas no laboratório e toda a paciência e ensinamentos.

A todos meus caros amigos do laboratório Luiza, Valéria, Youssef, Fernando, Thiago, Larissa, Mariana Boia, Daniele, Adriano, Daniela, Mariana, Marta, Matheus, Aline e Ana pelos bons momentos de convivência, ajuda e conselhos ao longo desses anos.

A minha família por todo apoio e incentivo a continuar sempre estudando e aprendendo mais. Aos meus queridos avós pelo eterno amor e paciência dedicados. Ao meu irmão Matheus por estar sempre junto comigo nessa caminhada.

A minha amada namorada e companheira Renata por todo amor e carinho fundamentais para minha felicidade nesses anos.

As agencias de fomento CAPES, CNPq, SETI e Fundação Araucária pelas bolsas de estudo de iniciação científica e mestrado e também pelo patrocínio aos projetos do laboratório.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	DIMORFISMO SEXUAL E MORFOLOGIA DE CEFALOTÓRAX DE <i>Loxosceles intermedia</i> .	9
Figura 2	ESTRUTURA BÁSICA DOS TRÊS GRUPOS DE PROTEÍNAS QUE CONTEM O NÓ DE CISTINA	17
Figura 3	ESTRUTURA BÁSICA DE PEPTÍDEOS PERTENCENTES À FAMÍLIA DO NÓ INIBIDOR DE CISTINA	18
Figura 4	ESTRUTURA DE PEPTÍDEO DA FAMÍLIA NÓ CICLICO DE CISTINA.	20
Figura 5	EXEMPLO DE ESTRUTURA DOS QUATRO SUBGRUPOS DE GFCK	21
Figura 6	COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS	30
Figura 7	COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACIDICAS DE DIFERENTES NOTINAS	31
Figura 8	ANALISE DA EXISTÊNCIA DE PEPTÍDEO SINAL.	32
Figura 9	PRODUTO DO PCR	32
Figura 10	PCR DE COLÔNIA	33
Figura 11	SEQUENCIA NUCLEOTÍDICA OBTIDA NO TRANSCRIPTOMADA GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> .	34
Figura 12	ANÁLISE DE PONTES DISSULFETO	35
Figura 13	SÍTIO DE N-GLICOSILAÇÃO.	37
Figura 14	POSSIVEIS CISTEINAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DO MOTIVO ESTRUTURAL.	38
Figura 15	WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO DE NTX EM CEPA AD494	39
Figura 16	SDS-PAGE DO TESTE DE MINIEXPRESSÃO EM MEIO 2xYT	47
Figura 17	SDS-PAGE DO TESTE DE MINIEXPRESSÃO EM MEIO TRIPTONA FOSFATO	47
Figura 18	WESTERN BLOTTING DA EXPRESSÃO EM SHUFFLE	48
Figura 19	SDS-PAGE DO PRODUTO ELUIDO NA PURIFICAÇÃO PADRÃO DA RESINA Ni^{2+} NTA AGAROSE	49
Figura 20	WESTERN BLOTTING DO PRODUTO PURIFICADO	50
Figura 21	GEL GRADIENTE SDS-PAGE 7,5-20% DO PURIFICADO EM CONDIÇÕES REDUTORAS E NÃO REDUTORAS	51

Figura 22	PURIFICAÇÃO DA NTX EM CONDIÇÕES REDUTORAS	52
Figura 23	SDS-PAGE DAS EXPRESSÕES DE NTX EM SHUFFLE T7 EXPRESS lysY UTILIZANDO O VETOR pET-32a.	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE AD494 APÓS A ADIÇÃO DE IPTG	40
Gráfico 2	CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE AD494 COM UMA MAIOR CONCENTRAÇÃO DE IPTG	41
Gráfico 3	CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE ROSETTA-GAMI APÓS A ADIÇÃO DE IPTG	42
Gráfico 4	CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE SHUFFLE T7 EXPRESS <i>lysY</i> APÓS A ADIÇÃO DE IPTG	44
Gráfico 5	CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE SHUFFLE T7 EXPRESS <i>lysY</i> APÓS A ADIÇÃO DE IPTG EM MEIOS ENRIQUECIDOS	45
Gráfico 6	CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE SHUFFLE T7 EXPRESS <i>lysY</i> COM VETOR pET-32a APÓS ADIÇÃO DE IPTG	53

RESUMO

As aranhas-marrons pertencem ao gênero *Loxosceles* que são representadas no Brasil pela existência de dez espécies de aranhas desse gênero. No Estado do Paraná, já foram descritas quatro dessas espécies, sendo que três delas, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, são consideradas de maior importância médica devido aos acidentes que causam. A *L. intermedia* é a espécie mais abundante em Curitiba e Região Metropolitana e também é responsável pelo maior número de acidentes envolvendo aranha-marrom. O veneno dessas aranhas é uma mistura cristalina de peptídeos, proteínas e enzimas de baixa massa molecular (5 – 40 kDa), sendo que as enzimas mais estudadas são as fosfolipases-D. Existem muitos peptídeos com atividade inseticida que foram descritos como componentes de venenos de aranhas, escorpiões, anêmonas e caracóis. Em veneno de *L. intermedia*, já foram identificados e purificados alguns peptídeos inseticidas. Recentemente, o transcriptoma de glândulas de veneno dessa espécie revelou que 24,1% do total de transcritos codificantes de toxinas referem-se a diversos peptídeos potencialmente inseticidas. O presente trabalho enfoca o estudo de um peptídeo presente no veneno de *L. intermedia* que é semelhante a uma neurotoxina (NTX), pois possui similaridade na sequência aminoacídica predita de 48,9% quando comparada com uma toxina inibidora de canal de sódio de insetos encontrada na aranha *Macrothele gigas*. A análise bioinformática da toxina em questão revelou massa molecular de ~10,4 kDa, a possível existência de cinco pontes dissulfeto e sua classificação como pertencente a família das notinas. A clonagem molecular da sequência de interesse foi realizada em dois diferentes vetores de expressão, pET-14b e pET-32a. A expressão em pET-14b foi favorecida em meio de cultura mais rico quando comparado ao convencional Luria-Bertani, denominado meio Triptona fosfato, o qual é suplementado com glicose. A expressão em pET-32a teve ótimo rendimento em meio triptona fosfato, porém o peptídeo se encontrava em corpos de inclusão. Diversas cepas de expressão de *E. coli* foram testadas para melhorar o rendimento. As cepas AD494 e Rosetta-gami não foram muito eficientes para produção do peptídeo pela quantidade produzida ou pela solubilidade. A cepa que apresentou o melhor rendimento e solubilidade na expressão foi a Shuffle T7 express lysY com pET-14b. Diferentes métodos de purificação do peptídeo recombinante foram testados, mas ainda com baixa eficiência. Os problemas de expressão foram praticamente resolvidos e novos protocolos de purificação são promissores para obtenção do peptídeo recombinante para testes biológicos. O interesse biotecnológico em clonar, expressar e caracterizar essas toxinas inseticidas presentes no veneno de *L. intermedia* é devido ao fato que a partir disso pode se tentar desenvolver um agente inseticida que não gere resistência como os inseticidas químicos e ainda que apresente baixa toxicidade para mamíferos.

ABSTRACT

Brown spiders belong to *Loxosceles* genus. In Brazil, ten species of *Loxosceles* are found. At the State of Paraná s were already described four species including the three most important for envenoming, which are *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* species. *L. intermedia* is not only the most numerous specie in Curitiba and neighboring but also causes the large number of envenoming accidents with brown spider. *Loxosceles* venom is a mixture of peptides, proteins and enzymes with low molecular mass (5 - 40 kDa). The best characterized toxins are the Phospholipases-D. Peptides with insecticidal activity are found in different venoms such as spiders, scorpions, cone snail and sea anemone. For the *L. intermedia* venom, there are some reported insecticidal peptides. Recently, the transcriptome of venom gland showed that 24.1% of all toxins codify transcripts which are from peptides potentially insecticides. Here we will focus in the study of a peptide from the *L. intermedia* venom that has 48.9% of similarity in predict amino acidic sequence with a neurotoxin found in *Macrothele gigas* venom. The bioinformatics analysis of sequence showed a peptide with ~10,4kDa of expected molecular mass, five intrachain disulfide bonds and one putative site for N-glycosylation. The molecular cloning of this sequence was performed in two expression vectors, pET-14b and pET-32a. The expression with pET-14b showed better results in rich medium supplemented with glucose, triptone phosphate, when compared with Luria-Bertani medium. pET-32a showed the best result in mass of peptide produced in triptone phosphate medium expression, but the peptides were in inclusion body. Several *E. coli* strains were tried to reach a best expression. AD494 and Rosetta-gami strains were not efficient in mass produced or solubility of recombinant peptide. The strain that showed the best results for mass produced and solubility was Shuffle T7 express lysY with pET-14b vector. For purification of peptide several protocols were tried with low success up to now. The expression problems were almost solved and new purification protocol has a great potential in peptide obtention for biological tests. The biotechnological interest in insecticidal peptides from *L. intermedia* venom leads to the possibility of new insecticidal compounds developing, specially aiming to avoid plague resistance as seen for chemicals compounds and minimizing collateral effects upon mammal animals.

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	9
LOXOSCELISMO	11
VENENO LOXOSCÉLICO	11
TOXINAS INSETICIDAS	13
PEPTÍDEOS RICOS EM RESÍDUOS DE CISTEÍNA	16
<i>Nó Inibidor de Cistina (ICK)</i>	17
<i>Nó Cíclico de Cistina (CCK)</i>	18
<i>Fator de Crescimento Nó de Cistina (GFCK)</i>	19
OBJETIVOS	21
OBJETIVOS GERAIS	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS	22
3.2 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA QUE CODIFICA O PEPTÍDEO MADURO	22
3.3 ANÁLISE DO INSERTO, DIGESTÃO E LIGAÇÃO EM VETOR DE EXPRESSÃO	23
3.4 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETRICAMENTE COMPETENTES E PCR DE COLÔNIA	24
3.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	24
3.6 TRANSFORMAÇÃO PARA EXPRESSÃO	25
3.7 TESTE DE EXPRESSÃO	25
3.8 ANÁLISES POR FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	25
3.9 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA	26
3.10 WESTERNBLOTTING (W.B.)	26
3.11 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	59

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, sub-ordem Labidognatha, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda (Platnick, 2011). São popularmente conhecidas como aranhas-marrons porque sua coloração varia de marrom claro até marrom escuro ou também como aranhas-violino por possuírem um desenho no cefalotórax que se assemelha a um violino (Futrell, 1992a). Essas aranhas possuem uma distribuição mundial, com mais de 100 espécies já descritas em vários países da Europa, África, Oceania, partes da Ásia, América do Norte, América Central e, principalmente, da América do Sul (Gertsch, 1967); (Da Silva *et al.*, 2004); (Platnick, 2008), (Chaim, 2011). Medem de 8 a 15 mm e suas pernas chegam a 30 mm, apresentam dimorfismo sexual, sendo que os machos possuem corpo menor e pernas maiores que as fêmeas. Ambos os sexos possuem seis olhos brilhantes em semicírculo sobre o cefalotórax, organizados em pares (Fig. 1) (Bucherl, 1972).

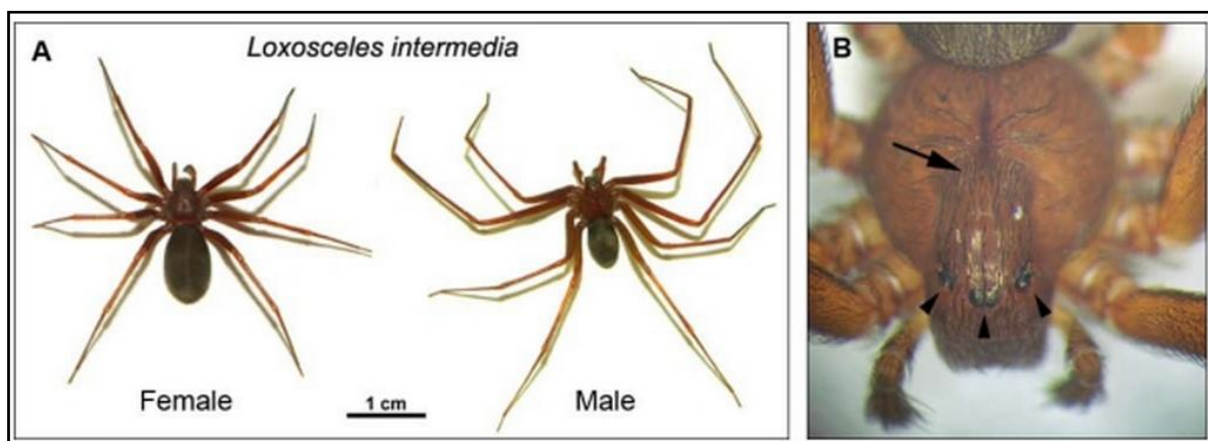


Figura 1. DIMORFISMO SEXUAL E MORFOLOGIA DE CEFALOTÓRAX DE *Loxosceles intermedia*.

A) Dimorfismo sexual de *Loxosceles intermedia*. B) Seta indica o desenho em forma de violino na face dorsal do cefalotórax. As pontas de setas indicam os três pares de olhos arranjados em semi-círculo. Adaptado de (Chaim, 2011)

As aranhas desse gênero são sedentárias, têm hábitos noturnos e não são agressivas, diferente de outros artrópodes e ofídios. Elas constroem teias irregulares que parecem fios de algodão pegajosos, alimentam-se de pequenos insetos e se reproduzem facilmente, mesmo em ambientes desfavoráveis. Elas podem suportar temperaturas de 8 a 43°C, e a maior ocorrência de acidentes com essas aranhas está nos meses quentes do ano (74% dos casos). Tanto os machos quanto as fêmeas são venenosos e podem sobreviver mais de 276 dias sem água ou alimento e apresentam uma sazonalidade com pico de atividade durante os meses quentes do ano (Futrell, 1992b; Chaim, 2011; Vetter, 2011).

No Brasil ocorrem dez espécies de *Loxosceles* (Tambourgi *et al.*, 2010), sendo quatro endêmicas do país: *L. similis* Moenkhaus, 1998 (PA, SP, MG e MS), *L. gaúcho* Gerstch, 1967 (RS e SP), *L. amazônica* Gerstch, 1967 (AM, MG e MA) e *L. puortoi* Martins, Knysak & Bertani, 2002 (TO) e quatro ocorrendo também em países vizinhos: *L. laeta* (RS, SP, RJ, MG e PR); *L. intermedia* Mello-Leitão, 1934 (PR, DF, RJ, SP e RS); *L. hirsuta* Mello-Leitão, 1931 (RS e PR) e *L. Adelaide* Gerstch, 1967 (RJ). No Paraná foram descritas quatro dessas espécies sendo que *L. intermedia* se mostrou a mais abundante seguida da *L. gaúcho*, *L. laeta* e *L. hirsuta* (Marques-Da-Silva e Fischer, 2005). As aranhas-marrons são conhecidas pelos acidentes que causam principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país, onde as espécies predominantes do gênero *Loxosceles* são *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaúcho* (Sezerino *et al.*, 1998; Malaque, 2002; Da Silva *et al.*, 2004). Dentre essas três espécies, a *L. intermedia* é a mais abundante e a que causa maior número de acidentes no estado do Paraná, como exemplo, apenas no ano de 2011 houve um total de 6985 casos de loxoscelismo registrados no Brasil e desses 4107 casos ocorreram no Paraná (SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2011). O fato da *L. intermedia* se mostrar como a mais abundante no estado provavelmente está relacionado com os hábitos mais generalistas dessa espécie, no que diz respeito a características ambientais e também por se locomover mais (Marques-Da-Silva e Fischer, 2005).

LOXOSCELISMO

A picada da aranha-marrom geralmente é indolor e em torno de 2 a 8 horas a dor pode variar de leve a severa e é relatada como “queimação” no local (Futrell, 1992b). O envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* é conhecido como loxoscelismo e esse pode resultar em dois quadros clínicos diferentes. O primeiro e mais comum quadro clínico, ocorrendo em 84 a 97% dos acidentados é o loxoscelismo cutâneo. Ele é caracterizado pelo aparecimento de uma lesão circundada por um halo vermelho, uma região pálida denominada placa marmórea (Rodrigues, 1986; Futrell, 1992b), que pode evoluir para lesão dermonecrotica com hemorragia local e espalhamento gravitacional (Algren *et al.*, 2011). Em alguns casos, a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma escara de difícil cicatrização que pode dar origem a sequelas deformantes e severas (Futrell, 1992b; Da Silva *et al.*, 2004; Bucarechi *et al.*, 2010). O surgimento do quadro cutâneo pode variar de pessoa para pessoa e também por outros fatores como a espécie da aranha, o estado nutricional, idade e local da picada no indivíduo.

O segundo quadro é o loxoscelismo sistêmico que ocorre em 3 a 16% dos acidentes com aranha-marrom e se caracteriza além da reação local, astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia, insônia e nos casos graves pode ocorrer hemólise, coagulação intravascular disseminada e falência renal aguda, esse quadro pode ocorrer independentemente do quadro cutâneo. Há uma possível prevalência desse quadro em crianças e jovens (Martinez-Vargas, 1987; Schenone *et al.*, 1989; Futrell, 1992b; Bravo *et al.*, 1993; DA SILVA *ET AL.*, 2004; Appel *et al.*, 2005; Chaim *et al.*, 2006; Wasserman, 2009; Algren *et al.*, 2011; Isbister e Fan, 2011)

VENENO LOXOSCÉLICO

O veneno das aranhas-marrons é uma mistura complexa de proteínas e enzimas de baixa massa molecular (5-40 kDa) (Da Silveira *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004; Marques-Da-Silva e Fischer, 2005; Mota, 1995; Appel, 2005), das quais as mais estudadas são as fosfolipases-D, hialuronidases, metaloproteases e serinoproteases (Futrell, 1992; Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000a; Veiga *et al.*,

2000b; Veiga *et al.*, 2001a; Veiga *et al.*, 2001b; Young e Pincus, 2001; Da Silveira *et al.*, 2002; Da Silveira *et al.*, 2007c; Da Silveira *et al.*, 2007b).

O transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* realizado por Gremski *et al.*, (2010) revelou a possível existência de doze classes de toxinas. Além das descritas anteriormente ainda existem as inseticidas (LiTx 1-4), as neurotoxinas, os inibidores de serinoproteases, proteínas tumorais controladas traducionalmente (TCTP) e alérgenos. O transcriptoma ainda revelou que toxina mais expressa na glândula produtora de veneno é a toxina inseticida LiTx 3, seguida pela metaloprotease e as fosfolipases-D são a terceira classe mais expressa de toxina. As fosfolipases-D (32-35 kDa), anteriormente denominadas de esfingomielinases-D, são as enzimas mais estudadas do veneno de aranha-marrom, devido ao fato de que elas sozinhas (formas nativas ou recombinantes) são capazes de causar muitos efeitos desencadeados pelo veneno total, como a lesão dermonecrótica, hemólise, falência renal aguda, permeabilidade vascular, intensa resposta inflamatória, edema e agregação plaquetária decorrentes da picada dessas aranhas (Da Silva *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2006; Chaves-Moreira *et al.*, 2011; Malaque *et al.*, 2011; Appel *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2007; Paludo *et al.*, 2009). Até o momento já foram clonadas e caracterizadas seis isoformas nativas de fosfolipases-D e uma mutada chamada LiRecDT1 H12A. A mutação sítio dirigida foi feita no sítio catalítico onde uma histidina na posição 12 foi trocada por uma alanina, isso acarretou em uma enorme redução de atividade da toxina, fazendo com que ela não fosse mais letal para camundongos (Kusma *et al.*, 2008). A primeira isoforma clonada e a isoforma mutada já tiveram suas estruturas determinadas por cristalografia de raios-X, essa fosfolipase-D de *L. intermedia* também teve a sua estrutura comparada com a fosfolipase-D de *L. laeta*. Essa análise mostrou que a fosfolipase-D de *L. intermedia* possui uma ponte dissulfeto a mais que a de *L. laeta* e ainda que deva compartilhar de um ancestral em comum com as fosfolipases-C encontradas em mamíferos e bactérias (De Giuseppe *et al.*, 2011; Ullah *et al.*, 2011).

Outra família de enzimas muito estudada é a das metaloproteases, sendo que os primeiros estudos identificaram uma enzima chamada de Loxolisina A, 20-28 kDa, que possuía ação proteolítica sobre fibronectina e fibrinogênio, e uma outra enzima gelatinolítica chamada de Loxolisina B, 32-35kDa, (Feitosa *et al.*, 1998). Tais

moléculas podem estar envolvidas com os distúrbios hemostáticos que ocorrem nos acidentes com aranhas-marrons, tais como: danos nos vasos sanguíneos e hemorragias na derme, além de poder ser um fator de espalhamento das demais toxinas do veneno devido sua ação frente aos componentes da matriz extracelular (Da Silveira *et al.*, 2002; Zanetti *et al.*, 2002). Posteriormente, uma metaloprotease foi identificada no veneno de *L. intermedia* através de uma biblioteca de cDNA. Ela foi clonada e expressa em sistema heterólogo em cepa de *E. coli* e caracterizada como pertencente à família das Astacinas, sendo denominada LALP (*Loxosceles* Astacin-Like Protease) (Da Silveira *et al.*, 2007a). Agora se sabe que existem mais duas isoformas de metaloproteases da família das astacinas no veneno de *L. intermedia* (LALP 2 e LALP 3) e pelo menos uma isoforma de astacina nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* (LALP 4 e LALP 5 respectivamente) indicando que há uma família de genes para astacinas possivelmente presente em todo gênero *Loxosceles* (Trevisan-Silva *et al.*, 2009).

Asproteínas da família da TCTP são altamente conservadas em eucariotos e possuem diversas atividades, entre elas a de regulação do ciclo celular (Gachet *et al.*, 1999). Como foram primeiramente descobertas em tumor mamário humano e a regulação da expressão era em nível traducional elas foram nomeadas de “Translationally-Controlled Tumor Protein” (TCTP). Essas proteínas também ser chamadas de fatores liberadores de histamina. A TCTP encontrada no veneno de *L. intermedia*, teve sua atividade testada na forma de proteína recombinante. Ela foi capaz de provocar edema de pata em camundongos e ainda aumentar a permeabilidade vascular quando injetada intradermicamente (Sade *et al.*, 2011).

TOXINAS INSETICIDAS

A maioria das toxinas inseticidas são peptídeos com baixa massa molecular variando de 2 a 12 kDa, encontrados nos venenos de aranhas, escorpiões e até mesmo em plantas (Dong, 2007), sendo que os venenos de aranhas apresentam uma maior concentração desses peptídeos que os venenos de escorpiões (Escoubaset *et al.*, 2000). Essas toxinas são classificadas de acordo com o seu modo de ação: elas podem afetar a transmissão glutamatérgica, de cálcio (Ca^{2+}), de sódio

(Na⁺), de potássio (K⁺) e de cloreto (Cl⁻). Algumas toxinas podem estimular a liberação dos neurotransmissores e outras podem bloquear os receptores colinérgicos pós-sinápticos (Rash e Hodgson, 2002). O principal alvo dessas toxinas são os canais iônicos de células nervosas e proteínas de membrana envolvidas na liberação de neurotransmissores em células pré-sinápticas (Rash e Hodgson, 2002). Devido à importância dos canais iônicos na excitabilidade celular eles são frequentemente alvo de neurotoxinas. Essa ligação com os canais iônicos de células do sistema neural afeta a excitabilidade dessas células de modo que pode levar à morte do organismo (Gomez *et al.*, 2002).

As neurotoxinas ligantes de canais iônicos também são muito úteis nos estudos sobre esses canais, pois normalmente cada toxina apresenta uma especificidade seja para canais de insetos, canais de mamíferos ou ainda para subtipos de canais como os subtipos T, L, N, P, Q e R de canais de Ca⁺ voltagem-dependente. Para canais de Na⁺ existem nove subtipos e a maioria deles é seletiva e reversivelmente bloqueada por nanomolares de moléculas como tetrodotoxina e saxitoxina (Rash e Hodgson, 2002; Nicholson, 2007). Estudos mostram que canais de Na⁺ de insetos são estrutural, fisiológica e farmacologicamente muito similares aos de vertebrados. Em alguns casos apresentando alta similaridade entre genes como no caso de *Drosophila* e rato (Zlotkin, 1999). Os primeiros peptídeos ligantes de canal de Na⁺ de mamífero identificados no veneno de aranha foram δ-atracotoxina Ar1 (robustoxina) e δ-atracotoxina Hv1 (versutoxina). Foram encontrados em aranhas australianas *Atrax robustus* e *Hadronyche versuta* respectivamente. Outros peptídeos ligantes de canais de Na⁺ já foram encontrados em aranhas, anêmonas e caramujos. Os canais de Na⁺ são alvos para diferentes drogas como anestésicos locais, anticonvulsivantes, antiarrítmicos e inseticidas de segunda geração como os piretróides (Estrada *et al.*, 2007b).

Para o veneno de *Loxosceles intermedia* já foi descrito a existência de pelo menos três toxinas com propriedades inseticidas nomeadas LiTx 1-3 (De Castro *et al.*, 2004). Essas toxinas foram purificadas do veneno total através de uma combinação técnicas cromatográficas, essas três isoformas de LiTx que possuem de 53 a 69 aminoácidos e diversos resíduos de cisteína cada, tiveram sua atividade biológica testada em larvas de insetos. Por similaridade, a LiTx 3 foi agrupada com

toxinas que interagem com canais de Na^+ enquanto LiTx1 e 2 ficaram no limiar entre interagir com canais de Na^+ ou de Ca^{2+} . Mais recentemente o transcriptoma da glândula produtora de veneno realizado por Gremski *et al.*, (2010), mostrou que 24,1% de todos os transcritos codificavam toxinas potencialmente inseticidas e esses foram agrupados em dois grandes grupos. O primeiro, chamado de LiTx, semelhantes às toxinas descritas por De Castro *et al.*, (2004). O segundo grupo chamado de neurotoxinas é constituído por transcritos codificadores de toxinas, que apresentam semelhança na sequência aminoacídica com uma neurotoxina ligante de canal de Na^+ denominada Magi3 encontrada na aranha *Macrothele gigas*, descrita por Corzo e Escoubas, (2003). Existem descritos 16 peptídeos ricos em cisteína no veneno de *Macrothele gigas*, muitos dos quais possuem atividades sobre canais de Na^+ tanto de insetos quanto de mamíferos (Corzo *et al.*, 2003; Satake *et al.*, 2004). Com a utilização de técnicas de biologia molecular essas toxinas estão sendo empregadas no controle de pragas para agricultura seja por transgenia como plantas de tabaco que expressam a toxina inseticida Magi6 (Hernandez-Campuzano *et al.*, 2009) ou ainda pela fusão de toxinas a lectinas de modo a produzir uma solução que quando ingerida pelas larvas de insetos passa para a hemolinfa de maneira eficiente, matando-as (Fitches *et al.*, 2004). Essas toxinas têm como característica possuírem grande quantidade de resíduos de cisteína em sua cadeia primária podendo pertencer à grande família estrutural das notinas.

A idealização desse trabalho veio a partir da realização do transcriptoma da glândula produtora de veneno *L. intermedia* por Gremski *et al.*, (2010). Nesse trabalho foram identificados dezenove EST que foram agrupados em nove grupos e representavam 1% dos transcritos de toxinas da glândula. Um dos clones da biblioteca do transcriptoma possuía uma sequência completa e idêntica à obtida em um dos grupos, número de acesso no GenBank HO004029.1. Então a partir desse clone o trabalho foi realizado seguindo as técnicas de biologia molecular descritas em (Sambrook, 2001).

PEPTÍDEOS RICOS EM RESÍDUOS DE CISTEÍNA

Peptídeos ricos em resíduos de cisteína podem ser divididos em 41 grupos de dobramentos diferentes e esses divididos em 98 famílias (Cheek *et al.*, 2006). Muitas das toxinas inseticidas pertencem à família das Notinas que é uma família de pequenas proteínas que apresentam geralmente de 6 a 10 resíduos de cisteína em sua estrutura primária. Elas são capazes de realizar até cinco pontes dissulfeto as quais se entrecruzam formando o motivo conhecido como nó de cistina, essas proteínas são chamadas de notinas do inglês “knottins”. Existem muitas proteínas que apresentam o motivo nó de cistina (cistina é como é chamado o dímero oxidado de cisteína) como fatores de crescimento, hormônios, inibidores enzimáticos e toxinas. Esses peptídeos geralmente apresentam menos de 100 aminoácidos em sua cadeia primaria. Existem três grupos principais de notinas: o Nó Inibidor de Cistina “Inhibitor Cystine Knot” (ICK), o Nó Cíclico de Cistina “Cyclic Cystine Knot” (CCK) e o Fator de Crescimento Nó de Cistina “Growth Factor Cystine Knot” (GFCK) (Fig. 2) (Daly e Craik, 2011b).

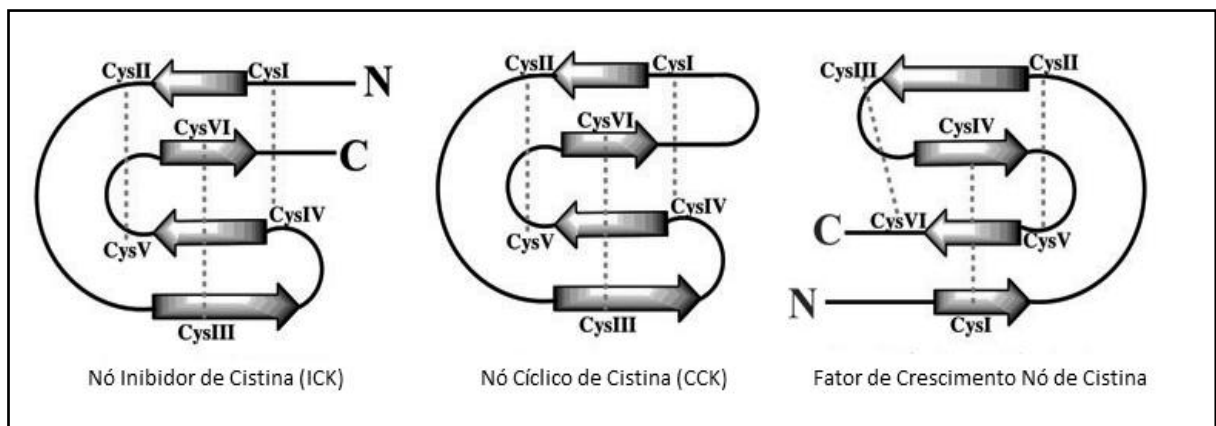


Figura 2. ESTRUTURA BÁSICA DOS TRÊS GRUPOS DE PROTEÍNAS QUE CONTEM O NÓ DE CISTINA. As setas representam as folhas betas e as linhas pontilhadas as pontes dissulfeto. As cisteínas são numeradas de I a VI. Adaptado de (Iyer e Acharya, 2011)

A presença das pontes dissulfeto confere a essas proteínas uma estrutura terciária extremamente estável. Essas proteínas podem ser fervidas, incubadas a 65° C por semanas ou ainda podem ser colocadas em 1N de HCl ou NaOH sem

perderem sua conformação ou funcionalidade (Werle *et al.*, 2007); (Heitz *et al.*, 2008), (Kimura *et al.*, 2009). Algumas notinas são capazes de resistir à ação de proteases plasmáticas e intestinais (Werle *et al.*, 2006; Werle *et al.*, 2008), podendo assim ser administradas por via oral.

Nó Inibidor de Cistina (ICK)

Os ICKs e CCKs são estruturalmente semelhantes diferindo apenas na estrutura cíclica dos CCKs. As fontes mais comuns de ICK são os venenos de aranhas, escorpiões e caramujos, mas eles também podem ser encontrados em plantas e fungos (Daly e Craik, 2011b). A estrutura básica das notinas é composta por três folhas beta dispostas de maneira antiparalela e estabilizada pelas pontes dissulfeto (Fig. 3). Esse motivo estrutural é a forma dominante nos peptídeos encontrados nos venenos de aranhas (King *et al.*, 2002). Acredita-se que os ICKs tenham surgido de uma classe de peptídeos precursora que possuía duas folhas betas e duas pontes dissulfeto chamada de “ β -hairpin” dirigido por pontes dissulfeto (DDH). Até agora esse motivo estrutural foi descrito para um peptídeo encontrado no escorpião *Liocheles waigiensis* chamado de U₁-LITX-Lw1a (Smith *et al.*, 2011). Esses peptídeos apresentam uma enorme gama de funções e alvos celulares, eles podem se ligar a diferentes regiões de canais de sódio voltagem dependente ou ainda a canais de sódio de mamíferos ou invertebrados (Li *et al.*, 2003).

Alguns estudos sugerem que a bicamada lipídica desempenha um papel importante na atividade dos ICK fazendo com que elas interajam com os canais iônicos das membranas (Lee *et al.*, 2004; Lee e Mackinnon, 2004; Suchyna *et al.*, 2004). Posokhov *et al.*, (2007), avaliaram a capacidade de cinco diferentes toxinas, VsTx1, GsMTx1 e GsMTx4 (da aranha *Grammostola spatulata*), SGTx1 (da aranha *Scodra griseipes*), HpTx2 (da aranha *Heteropoda venatoria*) em se ligar a diferentes membranas lipídicas. Mesmo essas proteínas possuindo certa conservação na sequência aminoacídica elas foram agrupadas em três classes distintas, a primeira de ligação hidrofóbica e eletrostática a membranas aniônicas, a segunda de forte ligação eletrostática a membranas aniônicas e a terceira que não se ligam a membranas em pH fisiológico. Isto é muito interessante, pois mostra que mesmo

toxinas semelhantes em mecanismos de ação possuem características bem distintas com relação à sequência aminoacídica.

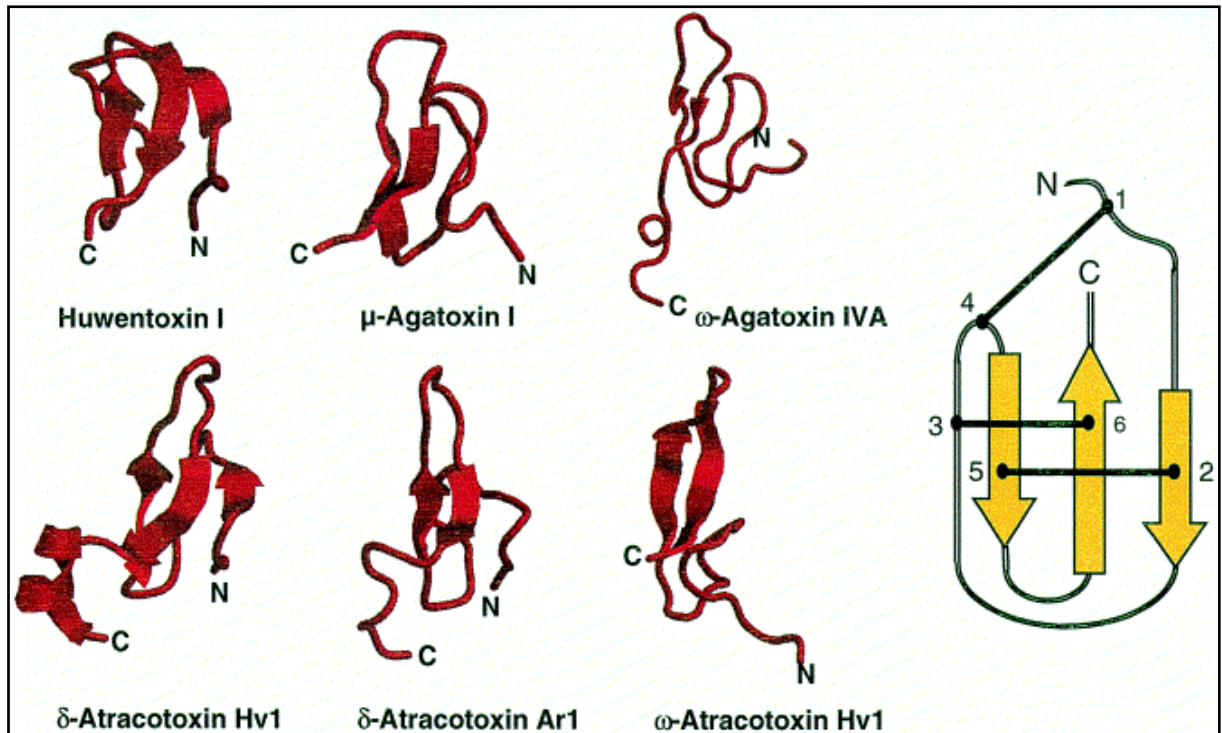


Figura 3. ESTRUTURA BÁSICA DE PEPTÍDEOS PERTENCENTES À FAMÍLIA DO NÓ INIBIDOR DE CISTINA. Em vermelho estruturas descritas para algumas toxinas de aranhas. A direita esquema de uma estrutura de ICK com folhas beta em amarelo ligadas por três pontes dissulfeto. Adaptado de ESCOUBAS; DIOCHOT e CORZO, 2001.

Nó Cíclico de Cistina (CCK)

Os peptídeos da família Nó Cíclico de Cistina também são chamados de ciclótídeos, traduzido do inglês “Cyclotides”, termo criado em 1999 para descrever uma nova classe de peptídeos cíclicos (Craig *et al.*, 2010). Esses peptídeos são encontrados em plantas, principalmente nas famílias das Rubiaceae, Violaceae e Cucurbitaceae (Ireland *et al.*, 2010), eles possuem em média 30 aminoácidos em sua cadeia primária sendo seis resíduos de cisteína totalmente conservados. O motivo pelo qual eles são chamados de ciclótídeos é devido à cadeia primária apresentar uma ligação peptídica no sentido cabeça-cauda, conferindo assim uma incrível

estabilidade contra proteases e em diferentes pHs (Craik *et al.*, 1999). Devido à enorme estabilidade química e biológica que os ciclotídeos apresentam eles podem ser usados em aplicações farmacológicas. O uso clínico de peptídeo cíclico já é bem conhecido como exemplo o imunossupressor ciclosporina que é amplamente utilizado. O primeiro uso conhecido dos ciclotídeos foi descoberto nos anos de 1960 em que mulheres da tribo africana Lulula utilizavam o extrato da planta *Oldenlandia affinis* como agente uterotônico para acelerar o nascimento de crianças (Craik *et al.*, 1999; Craik *et al.*, 2010). Porém apenas nos anos 1990 que o princípio ativo foi mostrado como um ciclotídeo chamado de Kalata B1 (Fig. 4). Outros ciclotídeos já tiveram suas atividades biológicas testadas como, anti HIV, antimicrobiano, antitumoral, antagonista de neurotensina e atividade tóxica sobre insetos, moluscos e nematodas (Henriques e Craik, 2010).

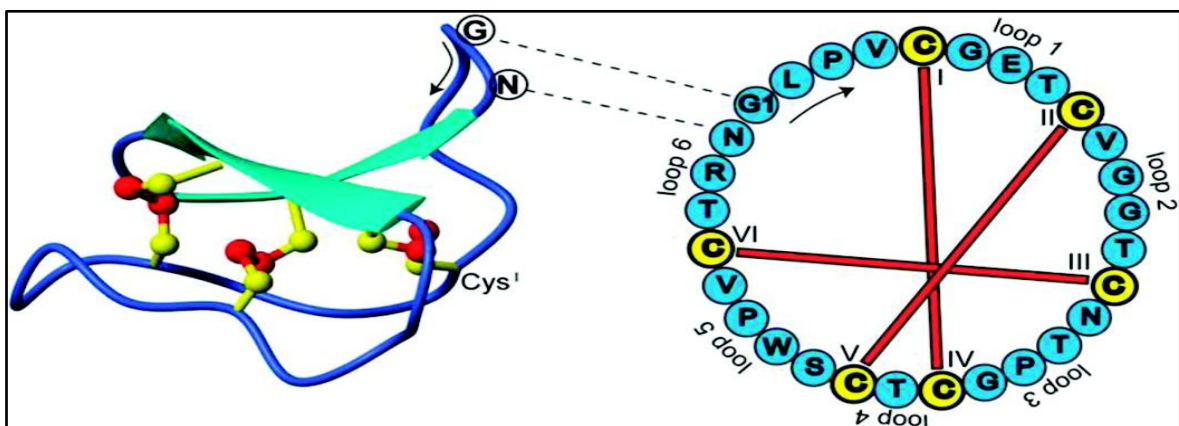


Figura. 4. ESTRUTURA DE PEPTÍDEO DA FAMÍLIA NÓ CICLICO DE CISTINA.

Exemplo o primeiro CCK descrito, Kalata B1. Encontrado na planta *Oldenlandia affinis* era usado por mulheres da tribo africana Lulula como agente uterotônico. G1 indica o primeiro aminoácido da cadeia polipeptídica e as linhas pontilhadas onde ocorre a ligação cabeça-cauda do peptídeo. Em vermelho estão representadas as pontes dissulfeto. Adaptado de CRAIK, D. J. 2010.

Fator de Crescimento Nó de Cistina (GFCK)

Fatores de crescimento são um grupo muito diverso de polipeptídeos e funcionam como agentes reguladores de sobrevivência celular, proliferação,

diferenciação comunicação célula-célula etc (McDonald e Hendrickson, 1993; Iyer e Acharya, 2011). Eles não só estão envolvidos em muitos processos fisiológicos normais das células, mas também estão envolvidos em algumas fisiopatologias. Quando comparadas as sequências aminoacídicas dessas pequenas proteínas a homologia é geralmente baixa (<20%), porém quando comparadas as estruturas tridimensionais existem alguns resíduos de aminoácidos invariáveis ou conservativamente substituídos que mantêm as estruturas conservadas (McDonald e Hendrickson, 1993). Os GFCK podem ainda ser divididos em quatro subgrupos exemplificados por fator transformador de crescimento (TGF- β), fator de crescimento de nervo (NGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e glicoproteína hormonal (GPHs) (Fig. 5). Um motivo consenso que pode ser utilizado para as três classes de peptídeos ricos em cisteína é Cys-(X)₃-Cys e Cys-X-Cys sendo mais duas cisteínas para formar o motivo nó de cistina (Vitt *et al.*, 2001). A forma ativa dos GFCKs é dimérica podendo tanto ser um homodímero quanto um heterodímero e a interação entre os monômeros pode ser através de pontes dissulfeto como no caso dos PDGFs ou ainda por interação hidrofóbica como ocorre no NGF (McDonald e Hendrickson, 1993).

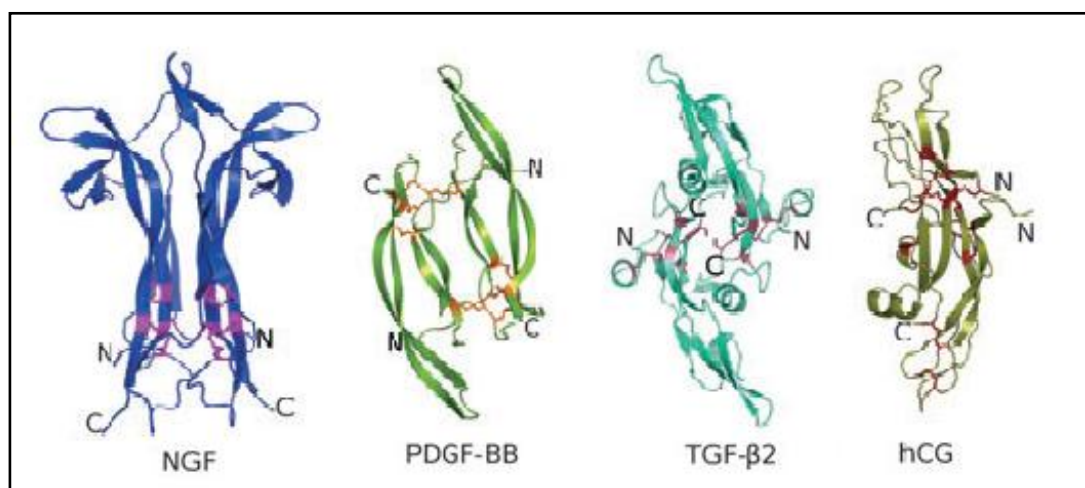


Figura 5. EXEMPLO DE ESTRUTURA DOS QUATRO SUBGRUPOS DE GFCK. Mostrando a diferentes interações entre os monômeros (Iyer e Acharya 2011).

OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Clonagem, expressão heteróloga de uma toxina semelhante à neurotoxina, presente no veneno de *Loxosceles intermedia*.

Objetivos específicos

- Obtenção e purificação da toxina recombinante.
- Avaliação da atividade biológica da toxina recombinante, em ensaios "*in vivo*" com intuito de elucidar sua participação no envenenamento com aranhas-marrons.
- Compreensão das atividades biológicas e seus respectivos mecanismos celulares e moleculares.
- Investigação de diferentes aplicabilidades biotecnológicas para a toxina recombinante.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Purificação de plasmídeos

A obtenção de cDNAs codificantes de notina presente na glândula produtora de veneno de *L. intermedia* foi feita partir da biblioteca de cDNA produzida no transcriptoma da glândula produtora de veneno realizada por Gremski, *et al* (2010), sequencia sob numero de acesso no GenBamk HO004029.1. O clone transformante da biblioteca que possui o cDNA referente a proteína de interesse foi cultivado por 16h a 37°C em meio LB líquido e realizou-se purificação dos plasmídeos por minipreparação utilizando um kit Wizard Plus SV Minipreps, DNA purification system (Promega, CA, USA). A quantificação da concentração dos plasmídeos foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm (Nanodroptm 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA.). Através da relação das leituras das amostras em 260nm e 280nm foi analisada a pureza da minipreparação, sendo somente utilizadas as amostras com relação 260/280nm acima de 1,8.

3.2 Obtenção da sequência que codifica o peptídeo maduro

Os plasmídeos purificados foram utilizados como moldes para amplificar o inserto de interesse em reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando a enzima *Pfu* DNA polimerase (Fermentas, Maryland, USA) que possui uma alta fidelidade. Com intuito de se obter as sequências somente das enzimas maduras, sem a região da sequência sinal, foram construídos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) que anelassem na região de início da proteína madura (primeiro GCT). O iniciador *sense* utilizado foi: 5'- CCG CAT ATG GCT GTT GTA TCA A - 3' e o “ iniciador *antisense* utilizado foi: 5'- GCG GAT CCG CTC AGT TGG TGA TTC C-3'. O iniciador *sense* foi desenhado contendo o sítio de restrição da enzima *NdeI* (sublinhado na sequência do iniciador). O iniciador *antisense*, foi desenhado com sítio da enzima de restrição *BamH I* (sublinhado na sequência do

iniciadores). As enzimas de restrições *Nde* I e *Bam*H I foram usadas para digerir tanto o inserto quanto o vetor de expressão pET-14b, para realizar a ligação direcional do inserto. Os oligonucleotídeos iniciadores foram cuidadosamente desenhados para que após a ligação do inserto no vetor fosse mantida a fase de leitura correta para a proteína de interesse.

3.3 Análise do inserto, digestão e ligação em vetor de expressão

Para analisar os produtos obtidos na PCR, as amostras de PCR foram submetidas à corrida eletroforética (7,5V/cm) em gel de agarose 1,5% (m/v) e adicionado brometo de etídio (0,5 µg/ mL) e analisado em transluminador de UV. A banda do DNA de interesse foi cortada do gel e o DNA extraído com kit de purificação de DNA de gel de agarose (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante. O inserto e o vetor pET-14b foram digeridos com as enzimas *Bam*H I e *Nde*I em microtubos separados seguindo as recomendações do fabricante (Fermentas Life Science, Maryland, USA). Após as digestões, os insertos e o vetor foram submetidos à eletroforese e as bandas purificadas do gel de agarose, como descrito acima. A ligação do inserto ao plasmídeo foi realizada na proporção 3:1 (inserto/vetor) com T4 DNA ligase (1 unidade) a 16°C por 16 horas. A ligação foi purificada por precipitação com etanol e acetato de sódio para ser utilizada para transformação de bactérias eletrocompetentes. O plasmídeo utilizado, pET-14b (Invitrogen), confere resistência à ampicilina que foi importante, pois permitiu que apenas as bactérias que receberam plasmídeos sobrevivessem no meio de cultura contendo o antibiótico. O pET-14b possui também sequência nucleotídica que depois de traduzida pode conferir uma etiqueta de 6 histidinas na porção N-terminal das proteínas recombinantes. Conforme a ligação realizada dos insertos de interesse, a proteína recombinante terá esses resíduos de histidinas na região aminoterminal. Esses resíduos são importantes, pois no momento da purificação elas conferem à proteína recombinante afinidade pelo níquel presente na coluna de cromatografia utilizada para purificação.

3.4 Transformação de bactérias eletricamente competentes e PCR de colônia

As construções, pET-14b/notina foram inseridos em *E. coli* da cepa DH5 α através do método de eletroporação. Os clones transformantes foram selecionados em meio LB-ágar (luria-bertani-ágar) contendo o antibiótico ampicilina 100 μ g/mL, sendo assim somente as colônias com plasmídeos conseguiram multiplicar. Os clones resistentes foram submetidos a uma PCR de colônia para verificação do inserto e para isso foram utilizados os iniciadores T7 e T7 “terminator” que anelam em regiões do vetor que flanqueiam a região de inserção. Desse modo, foi observada amplificação das colônias que receberam plasmídeo com inserto e plasmídeo vazio.

3.5 Reação de sequenciamento

Para realização do sequenciamento foi escolhido o clone positivo para o inserto, para que fosse analisado quanto à acurácia das bases e fase de leitura. Para reação de amplificação para sequenciamento foi usado o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Em dois tubos separados foram adicionados tampão Tris-HCl 200mM, pH8,0, MgCl₂ 5mM; 2 μ l de molde e reagente BigDye. Em um dos tubos foi adicionado iniciador T7 (0,2 μ M) e no outro o T7 “terminator” (0,2 μ M). No termociclador o seguinte protocolo foi seguido: 95°C/5min (1 ciclo); 95°C/15 s – 50°C/15 s – 60°C/4 min (35 ciclos); 4°C/ infinito. Para a precipitação do produto adicionou-se acetato de sódio/EDTA (1,5 M/0,25 M) (0,1 do volume inicial da reação) em seguida etanol absoluto gelado (3:1 v/v), homogeneizou-se bem e incubou-se em gelo por 10min. Em seguida é feita centrifugação a 20.000 g por 20 minutos, a temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante e o pellet é lavado com 500 μ l etanol 70%; centrifugou-se por 10min 20.000rcf a 4°C. Descartou-se completamente o sobrenadante e seca-se o pellet a temperatura ambiente retirando-se completamente o etanol (poderia interferir no sequenciamento). As amostras foram sequenciadas em sequenciador de oito capilares 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.6 Transformação para expressão

Para a expressão da proteína foi realizada uma purificação de plasmídeos do clone positivo através de minipreparação. Os plasmídeos obtidos por meio da minipreparação foram introduzidos na cepa de expressão de *E. coli* quimiocompetente, chamada de Shuffle T7 Express lys Y (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

3.7 Teste de expressão

Para o teste de expressão da proteína foi feito um pré-inóculo com 5mL de meio Triptona fosfato (2% triptona, 0,2% Na_2HPO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,8% NaCl, 1,5% extrato de levedura e 0,2% de glicose), colocado para cultivar a 30° C em um agitador a 200 rpm por 16h. O inóculo foi feito diluindo-se o pré-inóculo 1/50, em Erlenmeyer de 500 mL, em volume total de 125 mL e a cultura foi monitorada até atingir densidade ótica (DO_{600}) entre 0,4 e 0,8. A indução da expressão foi feita à 30° C pela adição de IPTG em três diferentes concentrações: 0,1; 0,4 e 1,0mM e amostras da cultura foram coletadas a cada hora. As amostras das diferentes condições de indução foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 20%, para verificar qual condição de expressão seria melhor para realizar a expressão em larga escala.

3.8 Análises por ferramentas de bioinformática

As primeiras análises referentes ao cDNA codificante a notina foram realizadas através de ferramentas disponíveis na internet. Foi avaliada a presença de peptídeo sinal no cDNA com o programa chamado SignalP, disponível no endereço (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). O programa ProtParam foi usado para prever massa molecular, ponto isoelétrico e coeficiente de extinção (<http://web.expasy.org/protparam>). Pelo fato do peptídeo ser rico em resíduos de cisteína foi utilizado o programa Disulfind (<http://disulfind.dsi.unifi.it>) para prever as pontes dissulfeto formadas. Para identificação da família a qual pertence o peptídeo a sequência foi comparada com o banco de notinas

(<http://knottin.cbs.cnrs.fr/DOC.php>). As modificações pós-traducionais como sítios de N-glicosilação foram avaliadas com o programa NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>).

3.9 Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida

Eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (20 %) contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras ou não. Os géis foram preparados utilizando o aparato comercial Mini-PROTEAN3 (Bio-Rad, Hercules, EUA). A solução de poliacrilamida, contendo os catalisadores APS e TEMED, foi colocada entre placas de vidro e isolada com uma camada de isobutanol. Após a polimerização, foi removida a camada de água e isobutanol acima do gel com auxílio de papel filtro. A solução de empacotamento, contendo 5% de poliacrilamida e os catalisadores, foi colocada acima do gel e nela foi posicionado o pente para formação dos poços. Após a polimerização, o pente foi removido e os poços secos com auxílio de papel filtro. A separação das proteínas foi obtida mediante aplicação de corrente de 25 mA constante, até a separação total das proteínas. Os géis foram corados em solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 (Amresco, Ohio, EUA) 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol (Harlow e Lane, 1988a)

3.10 WesternBlotting (W.B.)

Para confirmar a expressão da proteína foram realizados ensaios de “Western Blotting”. Amostras da cultura de bactérias foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 20% (SDS-PAGE) e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 16h a 25V. Em seguida as membranas foram bloqueadas por 2h com leite desnatado em pó diluído em PBS 3% (p/v). Os anticorpos primários anti-his (GE) foram diluídos (1:300) na mesma solução de

bloqueio (eles reconhecem a etiqueta de histidina da proteína recombinante). São incubados por 2h à temperatura ambiente e sob constante agitação. As membranas foram lavadas com o mesmo tampão na ausência de anticorpo e incubadas com anticorpos secundários IgG, de cabra, anti-IgG de camundongos conjugados com fosfatase alcalina (Sigma) por 1h à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM).

3.11 Purificação da proteína recombinante

A purificação do peptídeo recombinante expresso foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni^{2+} -NTA (Qiagen). A suspensão de células foi e lisada em prensa mecânica, French Press, a 1000 psi três vezes. O lisado foi centrifugado a 9000 g por 30 minutos e o sobrenadante incubado por 1h a 4°C com 100 μL de resina Ni^{2+} -NTA agarose em agitação moderada. A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com o tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM), sendo a $\text{D.O.}_{280\text{nm}}$ monitorada durante todo o procedimento de purificação. O peptídeo foi eluído quando a $\text{D.O.}_{280\text{nm}}$ atingiu 0,01, utilizando-se tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM). O grau de pureza do eluato foi analisado por eletroforese em gel SDS-PAGE 20% sob condições redutoras e a proteína obtida dialisada contra PBS pH 7,2. A suspensão da proteína solúvel foi quantificada por espectrofotometria em 280nm levando-se em consideração que 1mg/mL da proteína pura equivale a $\text{D.O.}_{280\text{nm}}=1,256$, de acordo com os parâmetros físico-químicos determinados com o uso da ferramenta ProtParam. As toxinas recombinantes purificadas também foram dosadas pelo método de (Bradford, 1976), aliqüotadas e mantidas a -20°C até o momento do uso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A possível notina (NTX) estudada nesse trabalho, sob número de acesso no GenBank HO004029.1, foi escolhida entre os transcritos do transcriptoma da glândula de veneno. Essa toxina apresenta uma similaridade de 48,9%, quando comparada a sequência nucleotídica traduzida com o banco de dados de proteínas utilizando o BLASTp, com uma toxina inibidora de canal de sódio de insetos. A toxina semelhante à encontrada no veneno de *L. intermedia*, pertencente à família das notinas e é encontrada na aranha *Macrothele gigas*, ela foi nomeada como Magi3 descrita por Corzo *et al.*, (2003), número de acesso P83559.1 (Fig. 6). Hoje em dia há um grande aumento na busca por compostos vindos da natureza e isso inclui os venenos de diferentes animais. Atualmente existem sete drogas comerciais aprovadas pelo departamento de controle de drogas e alimentos dos Estados Unidos (FDA) baseadas em venenos animais, sendo a mais conhecida o Captopril® (King, 2011). Sintetizado a partir dos estudos de um componente do veneno da serpente *Bothrops jaracaca* que potencializa a bradicinina por inibir a conversão de angiotensina I em II, o Captopril® evita assim a elevação da pressão arterial. Aprovada pelo FDA no início dos anos de 1980 foi a primeira droga de um bilhão de dólares. Mais recentemente está havendo um grande aumento no interesse por peptídeos bioativos de venenos, devido às suas diferentes ações como microbicidas, carreadores de drogas e inseticidas (Mamelak e Jacoby, 2007; Azevedo Calderon *et al.*, 2010; Daly e Craik, 2011a). Cerca de 50% das pesquisas por novos medicamentos das grandes indústrias farmacêuticas está em peptídeos bioativos (King, 2011). Dentre as drogas derivadas de venenos que estão em testes clínicos podemos citar alguns exemplos como: a Chlorotoxina de escorpião que esta sendo testada como marcador de tumor para cirurgias, pois ela se liga a anexina A2 e pode ser conjugada com um corante para visualização do tumor (Veiseh *et al.*, 2007). Há também o Leconotídeo de caracol marinho que se liga a canais de Ca^{2+} voltagem dependente e pode ser usado no tratamento de dor neuropática. (Kolosov *et al.*, 2010)

Devido ao grande uso ao longo do tempo de inseticidas químicos como os da classe dos piretróides gerou-se resistência em diferentes insetos como o barbeiro e

o mosquito transmissor da malária, o que representa um grande problema de saúde pública para países pobres onde essas doenças ocorrem (Fabro *et al.*, 2011; Nwane, 2011). A malária é uma doença responsável por matar até dois milhões de pessoas por ano no mundo (Ranson *et al.*, 2011). Os venenos de animais peçonhentos representam uma enorme fonte de moléculas bioativas que foram selecionadas e refinadas por milhares de anos ao longo da evolução. Essa seleção fez com que hoje possamos buscar nesses venenos moléculas mais potentes ou específicas para diferentes aplicações farmacológicas e biotecnológicas. O interesse biotecnológico em clonar, expressar e caracterizar toxinas inseticidas presentes no veneno de *L. intermedia* como as descritas por De Castro *et al.*, (2004) e a tratada nesse trabalho, deve-se ao fato que a partir disso pode-se tentar desenvolver um agente inseticida que não gere resistência como observado em inseticidas químicos como os piretróides e ainda que apresente baixa toxicidade para mamíferos, por não se ligarem aos canais iônicos desse grupo.

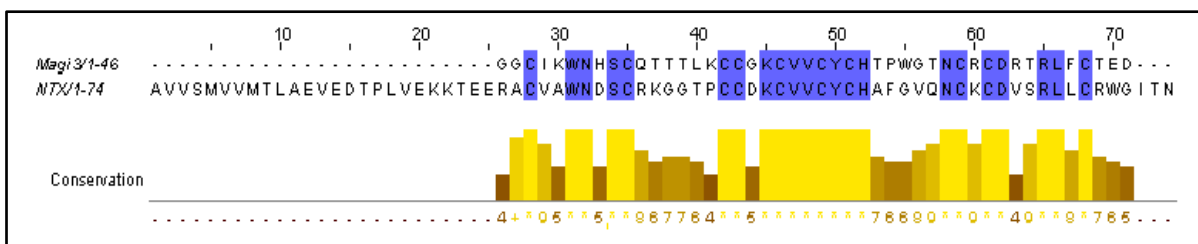


Figura 6: COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS.

A sequência predita para o peptídeo clonado (NTX, HO04029.1) de *L. intermedia* comparada com a sequência do peptídeo Magi3 (P83559.1) de *Macrothele gigas*, que é um peptídeo com atividade inseticida conhecida e atua sobre canais de sódio. Imagem gerada pelo programa JalView do ClustalW2. Em azul os aminoácidos conservados entre as duas sequências. Em amarelo/marrom a conservação relativa entre os aminoácidos das duas sequências.

A comparação da sequência aminoacídica de interesse com o banco de dados BLASTp também revelou uma conservação com outras duas toxinas encontradas no veneno da aranha *Plectreurys tristis* denominadas Plt XI e Plt VI, sob números de acesso P36985.2 e AAC47205.1, com similaridade de 47,4% e 42,7% respectivamente. A comparação entre os peptídeos mostra uma conservação total entre os resíduos de cisteína da NTX e da Magi3. Para os resíduos de cisteína da toxina de *L. intermedia* com os das toxinas de *Plectreurys tristis*, observa-se a

conservação de nove desses resíduos (Fig. 7). Existem pelo menos onze toxinas descritas para *Plectreurys tristis*, e a Ptl VI e XI possuem a capacidade de paralisar e matar larvas de Lepdopteras dos gêneros *Manduca*, *Heliothis* e *Spodoptera* que infestam plantações de tabaco. A Ptl VI é capaz de causar a morte das larvas de lepdopteras mesmo em baixas concentrações, $DL_{50} = 1\mu\text{g/g}$ de inseto (Quistad e Skinner, 1994), enquanto que outra toxina, Ptl II, que não possui similaridade com a NTX, é capaz de ligar-se a canais de Ca^{2+} voltagem dependente em *Drosophila* causando sua abertura (Jianget *al.*, 2005).

PltXI	1	-HLILASALICALVVCTFAEEQVNVFPLPDEREVKCIQWQYCR-GNLPCCDDCVMCECN
PltVI	1	KHLIFSSALVLCALVVCTFAEEQVNVFPLPDERAVKCIQWQETCN-GNLPCCNECVMCECN
Ntx	1	-----AVVSMVVMTLAEVEDTPLVEKKTEERACVAWNSCRKGGTPCCDKCVVCYCH
Magi3	1	-----GGCIKWNHSCQTTTLKCCGKCVVCYCH
		* * * * *
PltXI	59	IMG-QNCRCNHPRTSECGSRR-
PltVI	60	IMG-QNCRCNHPKATNECESRRR
Ntx	53	AFGVQNCKCDVSRLLCRWGITN-
Magi3	28	TPWGTNCRCDRTRECTED----
		* * *

Figura 7. COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACIDICAS DE DIFERENTES NOTINAS. Conservação da distribuição dos resíduos de cisteína. os dez resíduos da NTX (HO004029.1) se apresentam nas mesmas posições que os resíduos da Magi 3 (P83559.1). Tanto a Plt XI (P36985.2) quanto a Plt VI (AAC47205.1) possuem doze resíduos de cisteína conservados entre elas e dos quais nove são conservados em comparação com a NTX e a Magi3.

Com intuito de clonar a sequência de cDNA que codifica para a toxina de interesse, realizou-se uma minipreparação de plasmídeos a partir da biblioteca de cDNA. O DNA purificado foi utilizado como molde para técnica de PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados especificamente para a obtenção da sequência sem o peptídeo sinal (Fig.8). O produto desse PCR foi submetido a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% para análise (Fig. 9). Uma vez confirmado o tamanho do fragmento (244 pb) produzido pela PCR, esse DNA foi gel purificado e posteriormente dosado.

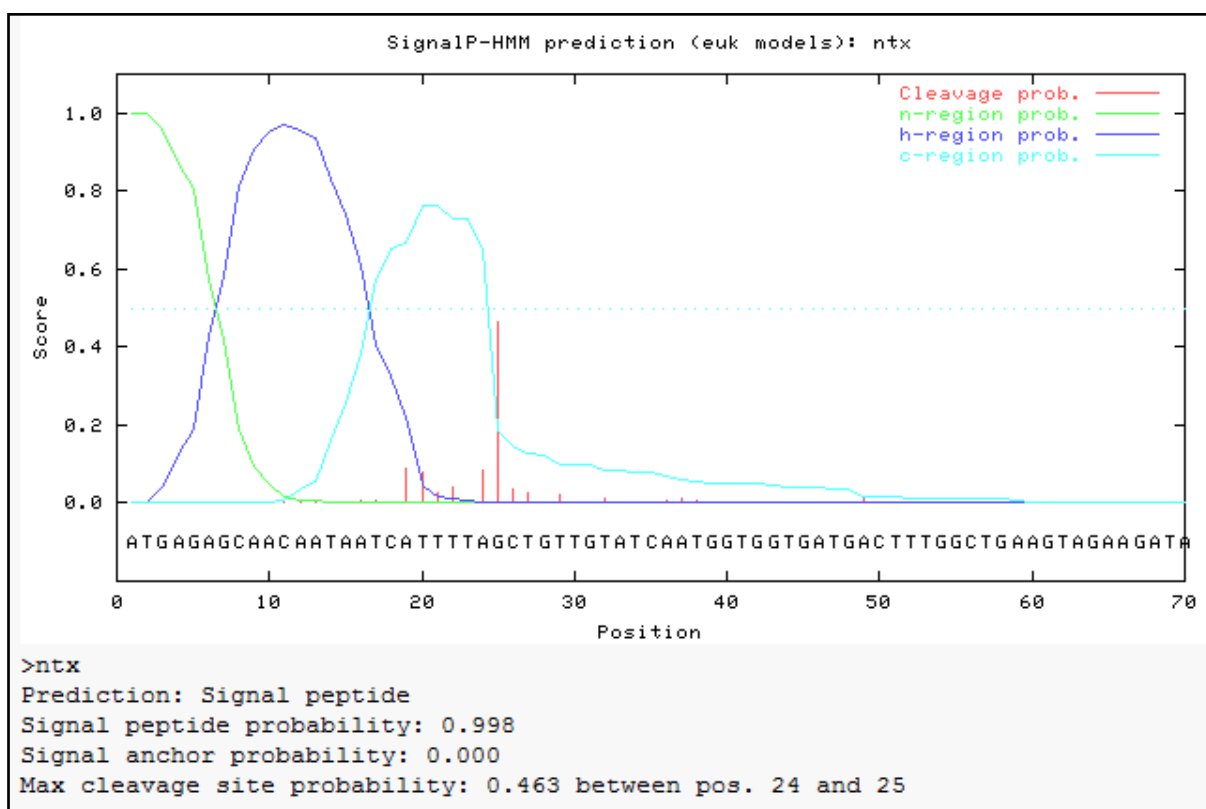


Figura. 8 ANALISE DA EXISTÊNCIA DE PEPTÍDEO SINAL.

A sequência nucleotídica obtida no transcriptoma foi analisada pela ferramenta online SignalP, que indicou a existência de um peptídeo sinal do nucleotídeo 1 ao 24. O oligonucleotídeo iniciador “sense” foi desenhado para se anelar a sequência a partir do nucleotídeo 25.

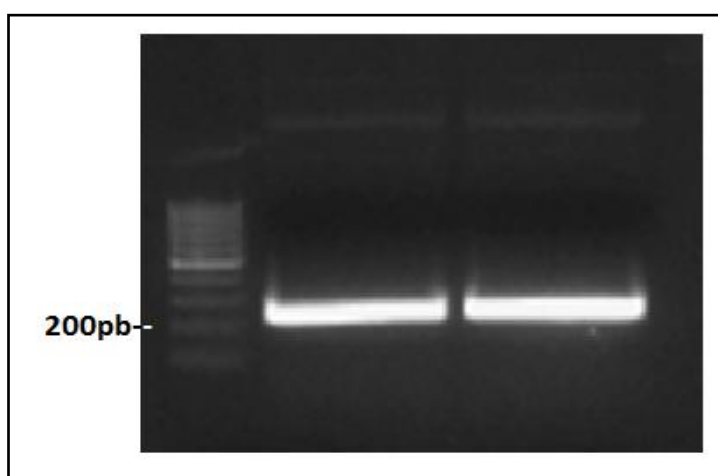


Figura 9: PRODUTO DO PCR. PCR realizado com os oligonucleotídeos iniciadores gene específicos. A amostra foi dividida em dois poços e produto se encontra na região esperada de 244 pb.

Para realizar a subclonagem do cDNA de interesse, o vetor de expressão pET-14b e o inserto (DNA gel purificado da fig. 9) foram submetidos à digestão pelas enzimas de restrição *Nde* I e *Bam*H I, como descrito no item 3.3 do materiais e métodos e a ligação foi feita com T4 DNA ligase. Durante essa etapa de ligação

foram encontradas algumas dificuldades, como contaminação de enzimas de restrição e a ligação do inserto no vetor foi difícil de ser realizada, fazendo com que essa etapa demorasse mais que o esperado. Após a ligação, realizou-se a transformação em *E. coli*, primeiramente em cepa DH5 α por eletroporação. As colônias que cresceram após a seleção com antibiótico foram submetidas a um PCR de colônia (Fig.10A) para avaliar se tais colônias possuíam vetor com ou sem inserto (vetor vazio recircularizado ou não digerido). Como pode ser observado na Fig. 10A, apenas 1 das 48 colônias testadas foi positiva, ou seja, somente 1 colônia possuía vetor com o inserto. Tendo em vista a baixa eficiência da ligação do inserto no vetor, a colônia positiva foi novamente testada em dois PCRs para confirmação da presença do inserto. O primeiro com oligonucleotídeos iniciadores gene-específicos descritos em materiais e métodos onde se esperava encontrar uma banda na altura de 244 pb. O segundo foi realizado com os oligonucleotídeos do vetor (T7 e T7 terminator) que flanqueiam o sítio de múltipla clonagem, o que produziria um produto de ~500 pb quando o vetor recebesse o inserto (Fig. 10B). O resultado dos dois PCRs foi positivo, foram observadas as duas bandas com tamanho correspondente ao esperado. O clone positivo encontrado no PCR de colônia realmente possuía o inserto de interesse, restava apenas saber se este inserto não possui nenhuma mutação ou erro na fase de leitura.

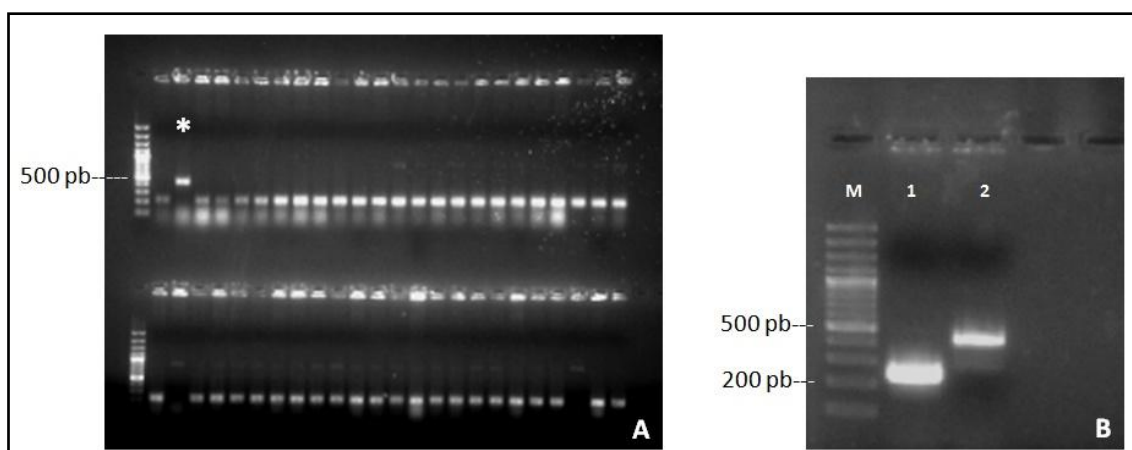


Figura 10. PCR DE COLÔNIA.

(A) Das 48 colônias testadas, apenas a segunda, marcada com asterisco, apresentou banda na altura de 500 pb. (B) PCR de colônia da colônia positiva na figura A, M marcador de massa molecular, 1 PCR com primers gene específicos (244 pb). 2 PCR com primers do vetor (500 pb).

A partir desse clone positivo foi realizada uma minipreparação de plasmídios que foi utilizada para o sequenciamento da construção com intuito de se verificar a fase de leitura e possíveis alterações de bases na sequência de interesse. As sequências obtidas nas reações de sequenciamento foram comparadas com a sequência obtida no transcriptoma realizado por GREMSKI *et al.* 2010, e apresentaram 100 % de identidade na sequência nucleotídica, essa sequência foi então utilizada nas diferentes análises bioinformáticas. A figura 11 mostra a sequência codificante completa da toxina obtida no transcriptoma, com a sua sequência aminoacídica predita e oligonucleotídeos iniciadores utilizados para subclonagem.

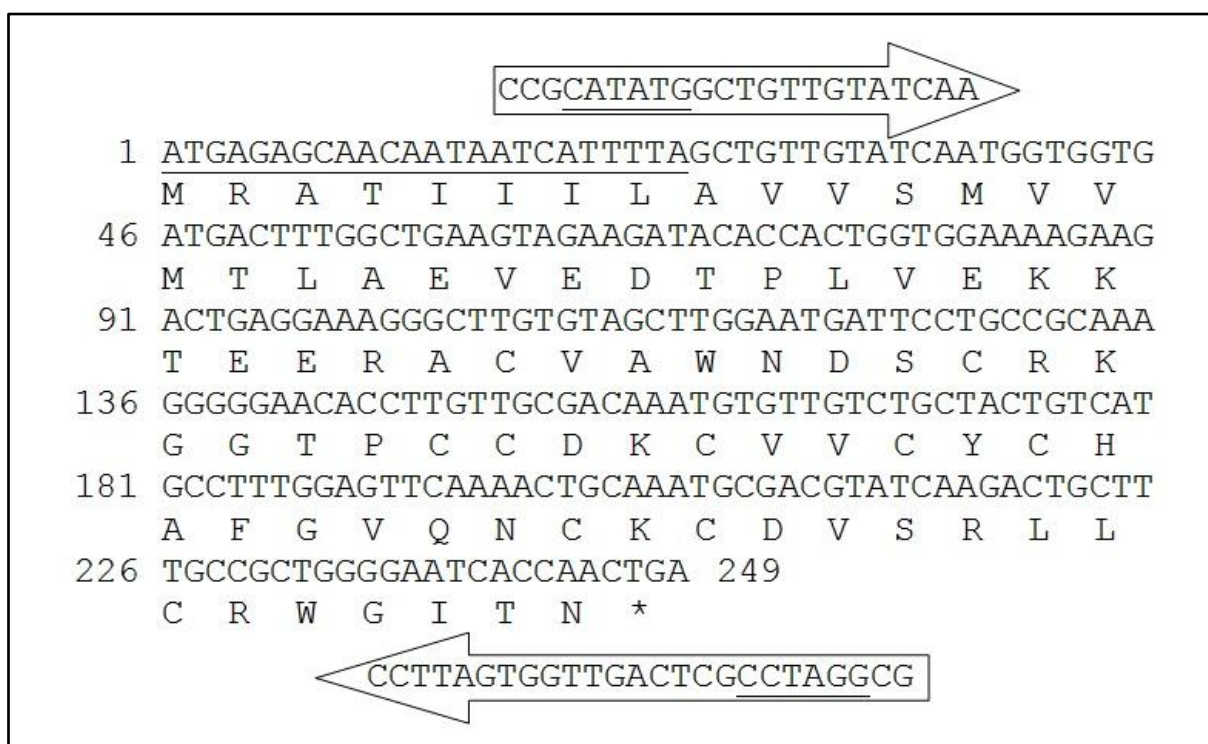


Figura 11. SEQUENCIA NUCLEOTÍDICA OBTIDA NO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *L. intermedia*.

Sequência aminoacídica predita para o cDNA obtido, indicada no código de aminoácidos de uma letra. Setas indicam os oligonucleotídeos iniciadores produzidos para a subclonagem em vetor de expressão pET-14b, regiões sublinhadas indicam os sítios de restrição. Sequência nucleotídica sublinhada (1-24) representa o peptídeo sinal predito pelo programa SignalP. A sequência nucleotídica subclonada sem o peptídeo sinal foi analisada por sequenciamento e mostrou 100% de homologia com a sequência obtida no transcriptoma.

Devido à grande quantidade de resíduos de cisteína na sequência primária do peptídeo, realizou-se uma análise das possíveis pontes dissulfeto que comporiam o peptídeo no programa Disulfind (Ceroni, 2006). O resultado mostrou a possível existência de 5 pontes intracadeia com coeficiente de conectividade maior que 0,96 (Fig. 12), esse valor indica a probabilidade das pontes dissulfeto se formarem, sendo o valor máximo igual a 1,0.



Análise da sequência aminoacídica predita, revelando as possíveis cinco pontes dissulfeto. DB_state=1 corresponde a ponte dissulfeto formada. DB_conf) confiabilidade das cisteínas estarem ligadas, max=10. DB_bond) ponte dissulfeto formada entre os resíduos de cisteína. Conn_conf) confiabilidade da conectividade entre as cisteínas, max=1,000

Na busca por outras modificações pós-traducionais, a sequência foi analisada em diferentes ferramentas de bioinformática disponíveis. A única modificação encontrada foi referente à presença de um sítio de N-glicosilação na asparagina 32 (Fig. 13). Porém, como esse sítio encontra-se entre outros dois resíduos de cisteína que provavelmente participam de pontes dissulfeto, apenas uma pequena alça ficaria exposta para a glicosilação. Como o potencial de glicosilação predito para esse sítio está muito pouco acima do limiar, é pouco provável que essa glicosilação ocorra. A procura das possíveis modificações pós-traducionais que podem ocorrer em proteínas ajudam na escolha de um melhor sistema heterólogo para cada caso. Como bactérias não realizam glicosilação de proteínas se isso for importante para solubilidade ou atividade da proteína seria recomendável a troca de organismo para expressão. Nesse ínterim, o mesmo pode ser discutido para a formação de pontes dissulfeto uma vez que bactérias não realizam a formação de pontes dissulfeto no citoplasma, por esse ser muito redutor. Portanto não seria indicado realizar a expressão de proteínas dependentes de ponte dissulfeto para sua atividade em bactérias. Porém como bactérias são organismos amplamente utilizados na expressão de proteínas recombinantes, há no mercado uma série de cepas de expressão que favorecem a formação dessas pontes no citoplasma bacteriano. Isso pode ser favorecido tanto pela presença de pontes dissulfeto isomerases como encontrado na cepa Shuffle T7 Express lysY (New England Biolabs, Ipswich, EUA) ou pela deficiência de proteínas redutoras como no caso das cepas AD494 e Rosetta-gami (Novagen, Darmstadt, Alemanha).

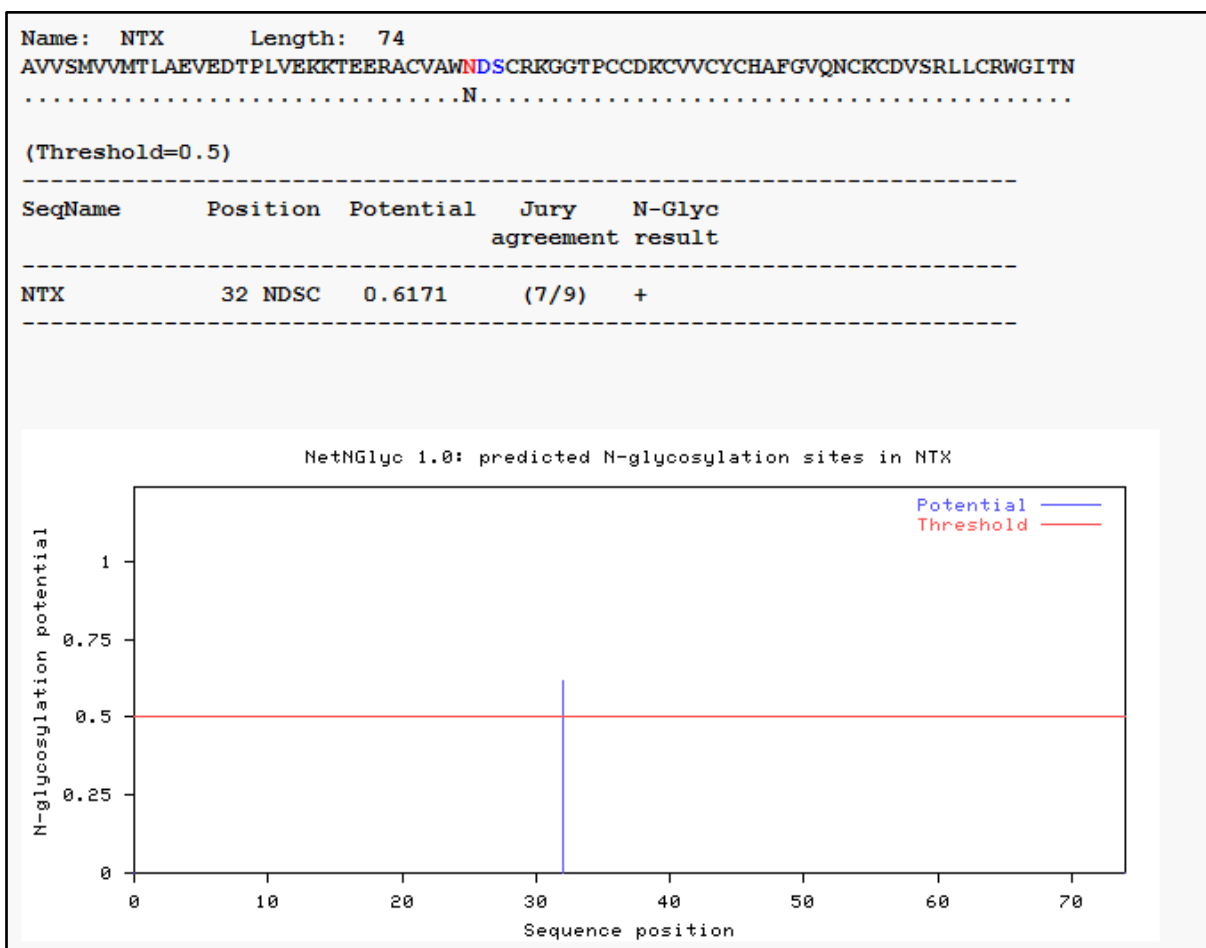


Figura 13: SÍTIO DE N-GLICOSILAÇÃO.

Na cadeia aminoacídica foi encontrado apenas um sítio para N-glicosilação na asparagina 32, mas com um baixo potencial para glicosilação.

Devido ao grande número de resíduos de cisteína na sequência primária do peptídeo de interesse e pela homologia da sequência aminoacídica com o peptídeo Magi3, que pertence à família das notinas, foi feita uma análise para identificar a qual família o peptídeo clonado de *L. intermedia* pertence. Para isso a sequência aminoacídica predita foi analisada pela ferramenta Knoter1D, onde foi mostrado que o cDNA de *L. intermedia* clonado corresponde a um peptídeo da família das notinas. Esse peptídeo possui seis resíduos de cisteína alinhados, quando comparados com outros peptídeos da família das notinas. O comprimento das alças formadas entre essas cisteínas foi considerado ótimo para família das notinas. Os seis resíduos que participariam da formação das três pontes dissulfeto que formariam o motivo nó de

cistina seriam o C28, C35, C42, C43, C46 e C51 sendo que os resíduos C49, C59, C61 e C68 não seriam os mais importantes para a formação do motivo estrutural (Fig14). A ferramenta Knoter1D não indica qual é a sequência de ligação entre esses resíduos cisteínas, como o obtido pelo programa Disulfind. Cruzando os dados do Knoter1D e segundo a descrição de Iyer e Acharya, (2011) e Escoubas *et al.*, (2000) a ligação entre os seis resíduos formadores do nó seria C28-C43, C35-C46 e C42-C51, o que difere do resultado fornecido pelo Disulfind. O real padrão de ligação entre os resíduos de cisteína só será obtido com dados experimentais no futuro. Seguindo a nomenclatura sugerida por Gremski *et al.*, (2010) no trabalho do transcriptoma da glândula produtora de veneno, o peptídeo desse trabalho é referido como NTX por sua similaridade a neurotoxina Magi 3.

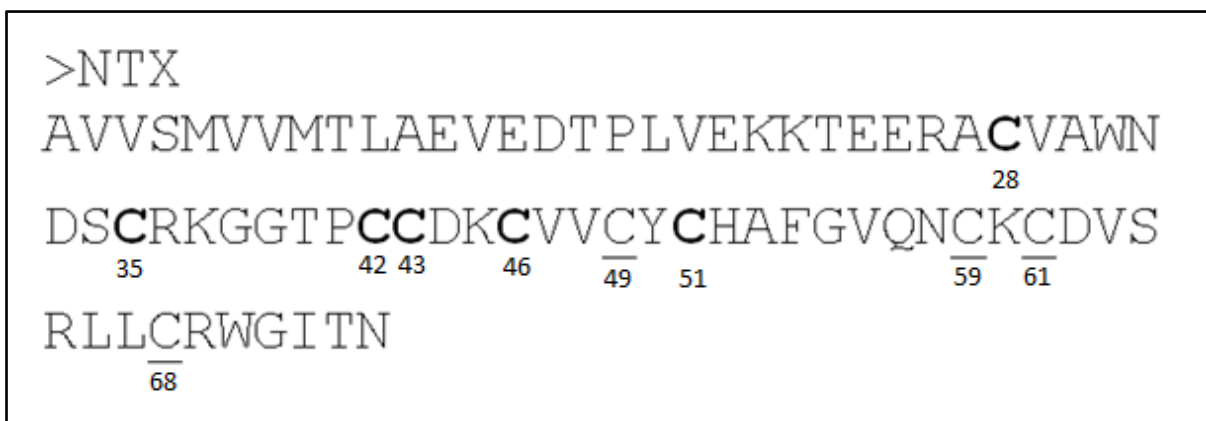


Figura 14. POSSÍVEIS CISTEINAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DO MOTIVO ESTRUTURAL.

Cisteínas em negrito seriam os resíduos envolvidos na formação do nó de cistina. Resíduos de cisteína sublinhados provavelmente realizam pontes dissulfeto como mostrado pelo programa Disulfind, mas pelo programa Knoter1D não seriam necessários para a formação do motivo estrutural.

Após a confirmação da sequência e as análises de bioinformática, a construção pET-14b/NTX foi transformada em cepa de expressão de *E. coli* AD494. Os primeiros testes de expressão do peptídeo recombinante foram realizados nessa cepa, pois ela é deficiente de tioredoxina *trxB* o que favorece a formação de pontes dissulfeto no citoplasma bacteriano, o que permitiria que o peptídeo ficasse com um dobramento mais correto. Nesses testes as bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (1% de triptona, 0,5 de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio) e cultivadas à 37° C o procedimento usado foi o mesmo descrito no item 3.7 de materiais e métodos. Porém quando analisada a expressão por SDS-PAGE

corada com azul de Coomassie R-250, não foi observada nenhuma banda referente ao peptídeo recombinante (dado não mostrado). Supondo que a quantidade de peptídeos expressa tenha sido baixa, foi feito um W. B. uma vez que esse método apresenta uma sensibilidade de detecção de proteína muito superior ao azul de Coomassie (Harlow e Lane, 1988b). Como o W. B. foi realizado com um controle positivo para aferir a qualidade dos reagentes e da reação e esse funcionou perfeitamente, a banda de baixa intensidade observada referente ao peptídeo recombinante (Fig. 15) sugere que o peptídeo tenha sido expresso em quantidades muito baixas.

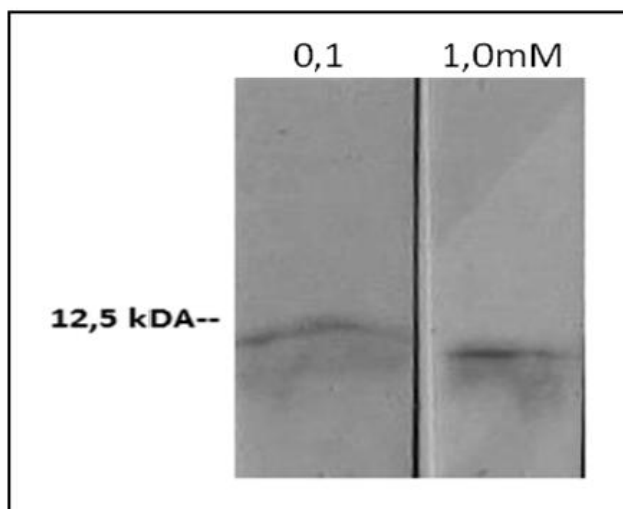


Figura. 15. WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO DE NTX EM CEPA AD494.

Produto da expressão visto apenas por W.B. devido à baixa quantidade produzida pela expressão heteróloga. 0,1-representa a quantidade de IPTG utilizada em mM como indutor. 1,0-quantidade de IPTG usada, mesmo sendo dez vezes maior que a anterior a expressão final não foi superior como o esperado.

Outro fato detectado nessa expressão foi que a cultura de bactéria apresentou um crescimento final inferior ao observado na expressão de outras proteínas recombinantes produzidas no nosso laboratório (gráfico 1). Amostras da cultura foram coletadas imediatamente antes da adição de IPTG e, então, de hora em hora após a indução, tendo sempre sua densidade óptica ($D.O_{550}$) medida. A $D.O_{550}$ máxima medida foi 0,990 na cultura induzida com 0,05 mM de IPTG, enquanto que para outra toxina da família das notinas expressa no nosso laboratório nas mesmas condições a $D.O_{550}$ máxima fica em torno de 1,400. Essa notina anteriormente expressa pelo nosso grupo é semelhante à LiTx 3 descrita por De Castro *et al.*, (2004), e a sua expressão rende em média 10 mg/L de cultura de

toxina solúvel. As mesmas amostras utilizadas para análise de expressão por SDS-PAGE (dado não mostrado) e W.B (Fig. 15), foram usadas para montar o gráfico 1.

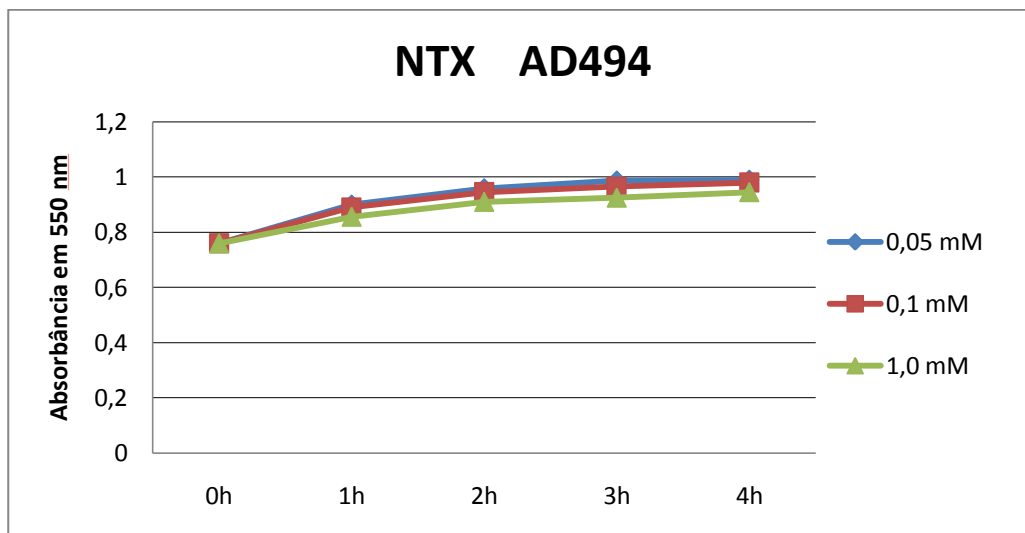


Gráfico 1. CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE AD494 APÓS A ADIÇÃO DE IPTG.

É possível observar uma pequena dificuldade de crescimento quanto maior é a concentração de IPTG. O crescimento final das três culturas também foi menor que o observado para expressão de outras proteínas. Meio de cultivo utilizado: LB e cepa AD494.

Com o intuito de aumentar a quantidade de peptídeo expressa foi realizado mais um teste de expressão com a mesma cepa de bactéria (AD494), porém dessa vez foi realizada uma curva de expressão com maiores concentrações de indutor e com uma hora a mais no tempo de indução que a cultura anterior. O interessante observado nesse teste foi que as culturas atingiram um platô de crescimento em torno de duas horas após a indução e D.O₅₅₀ máxima de 0,840 para as culturas de 1,0 e 3,0 mM de IPTG (gráfico 2). Essa rápida parada no crescimento das culturas pode ter ocorrido tanto por ação da proteína recombinante expressa, por apresentar alguma toxicidade às bactérias quando presente no citosol ou no meio de cultura (Heitz *et al.*, 2001; García-Olmedo *et al.*, 1998), quanto pela indução levemente tardia, uma vez que a indução deveria ser feita com D.O₅₅₀ entre 0,4-0,6 (Sambrook, 2001). Porém, por experiência do laboratório com outras toxinas de aranha-marrom, a expressão já foi induzida com a cultura um pouco acima da faixa recomendável sem prejuízo para o crescimento final da cultura. A mesma indução tardia é descrita

na literatura para expressão algumas proteínas como, inibidores de serpina e de VEGF sem nenhum prejuízo para o crescimento das culturas ou para produção das proteínas. (Lamark *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007).

Nesse novo teste a quantidade total de peptídeo expressa foi baixa, não apresentando quantidade superior a qualquer proteína presente na bactéria, quando analisada por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie (dado não mostrado). Quantidade essa que foi bem semelhante à obtida no teste de expressão anterior, mostrando que a quantidade de indutor não era o fator limitante para produção do peptídeo de interesse.

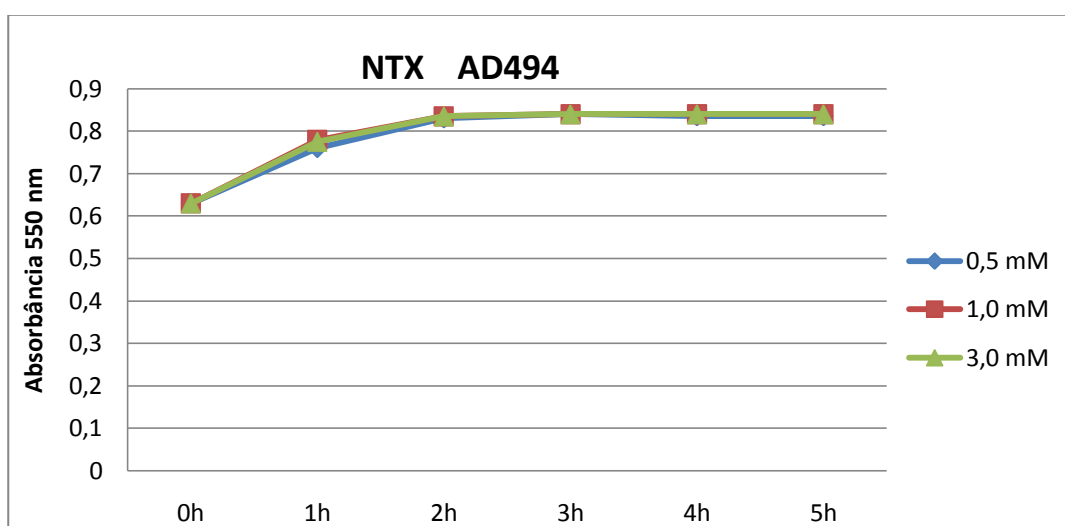


Gráfico 2. CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE AD494 COM UMA MAIOR CONCENTRAÇÃO DE IPTG.

Observa-se que as três culturas atingiram um platô de crescimento 2 horas após a adição de IPTG. O crescimento final ficou próximo ao observado anteriormente. Meio utilizado: LB e cepa AD494.

Com base nos resultados insatisfatórios obtidos com a cepa AD494 uma segunda bateria de testes foi feita com a cepa Rosetta-gami, que além dos tRNAs normais de *E. coli*, possui tRNAs para códons raros em bactérias e ainda um citoplasma menos redutor mais propício para formação de pontes dissulfeto. A análise de códons da sequência nucleotídica codificante para NTX mostrou a presença de cinco códons raros para bactérias que são favorecidos por essa cepa (3x GGA= Gly, 1x AGA= Arg e 1x AGG= Arg), sendo assim havia uma possibilidade

da expressão ser favorecida. Como a Rosetta-gami possui um crescimento mais demorado que outras cepas de *E. coli*, a expressão foi realizada por 19h a 25° C, para fins de padronização da expressão foram coletadas amostras antes e após indução para análise por SDS-PAGE. A medição da densidade ótica das culturas mostrou uma multiplicação menor do que a esperada comparativamente na expressão de outras toxinas já obtidas no nosso laboratório (gráfico 3). A absorbância máxima medida para expressão do NTX foi 0,622 em 19 horas de expressão para a cultura induzida com 0,5 mM de IPTG. Enquanto que para a metaloprotease do tipo das astacinas encontrada no veneno que também teve sua expressão testada em Rosetta-gami a absorbância máxima medida ficou em torno de 1,300. A expressão obtida em Rosetta-gami quando comparada com a expressão de AD494 por SDS-PAGE corado com Coomassie, foi levemente superior, porém a proteína se encontrava insolúvel em corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são agregados de proteínas insolúveis no citoplasma bacteriano, eles são compostos quase exclusivamente por proteínas recombinantes no caso de expressão heteróloga. Essa agregação pode ocorrer devido à sobrecarga da maquinaria de tradução das bactérias normalmente gerando proteínas mal dobradas e sem atividade biológica. Essa sobrecarga na maquinaria de tradução acaba desencadeando uma resposta de defesa nas bactérias similar a que ocorre no choque térmico fazendo com que essas proteínas se agreguem o que facilitaria o crescimento bacteriano (García-Fruitós *et al.*, 2011; Gatti-Lafranconi *et al.*, 2011). Essa formação de corpos de inclusão também é descrita para a expressão de peptídeos ricos em resíduos de cisteínas, e proteínas tóxicas o que acaba levando ao processo de redobramento desses peptídeos após a expressão para que eles se tornem solúveis e ativos (Goto *et al.*, 2003; Estrada *et al.*, 2007a). Esse processo de redobramento geralmente é um processo dispendioso em trabalho e recursos e às vezes com baixa eficiência, por isso não foi testado como uma tentativa de obter o peptídeo solúvel nesse momento.

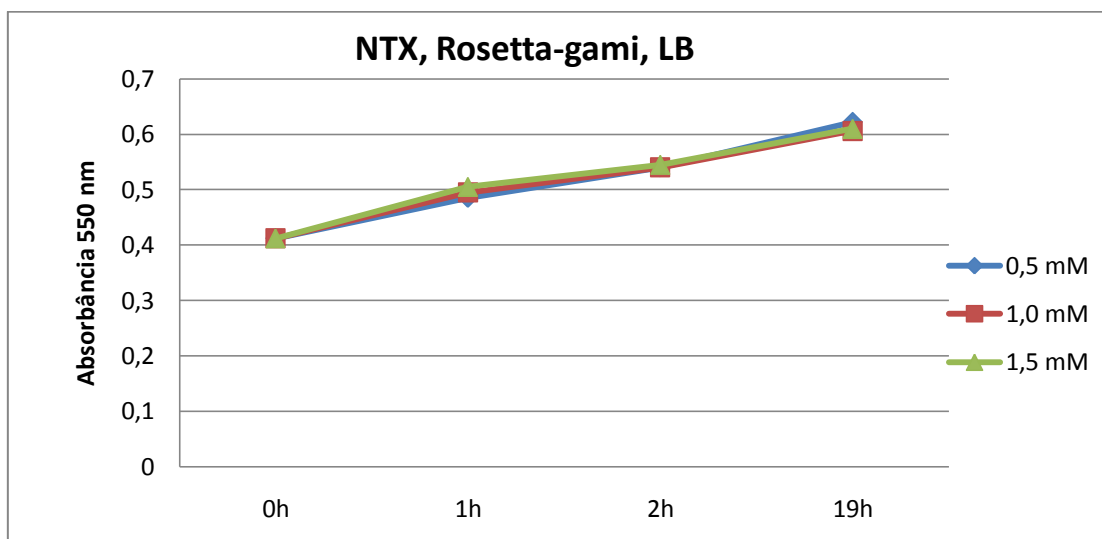


Gráfico 3. CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE ROSETTA-GAMI APÓS A ADIÇÃO DE IPTG.

Como essa cepa Rosetta-gami possui um crescimento mais lento, o tempo de expressão foi estendido nesse teste.

Com intuito de reduzir a formação dos corpos de inclusão outros testes foram realizados. Foi realizada a redução da temperatura de expressão para 16° C, pois com menor temperatura o metabolismo bacteriano é reduzido diminuindo a taxa de expressão e favorecendo a não agregação do peptídeo recombinante. Foi testado também o aumentada quantidade de indutor até 3 mM e o tempo de expressão até 24 horas para tentar se obter uma massa maior de peptídeo. Mas mesmo todos esses testes não apresentaram resultados melhores que os obtidos inicialmente para essa cepa, a quantidade de peptídeo expresso se manteve baixa, assim como a permanência deles em corpos de inclusão.

Uma vez que não houve sucesso na expressão com as cepas AD494 e Rosetta-gami, uma nova cepa foi testada. Essa nova cepa de expressão de *E. coli* é chamada de Shuffle T7 express lysY, essa cepa é deficiente em duas redutases, a glutaredoxina e a tioredoxina, o que favoreceria a formação de pontes dissulfeto no citoplasma. Ela ainda possui uma enzima ponte dissulfeto isomerase que também atua como uma chaperona no citoplasma, ajudando no dobramento correto das proteínas tendendo a evitar a formação de corpos de inclusão, e ainda a

proporcionar o correto dobramento de proteínas durante a expressão heteróloga. Essa cepa já foi utilizada para a expressão de algumas proteínas tóxicas para bactérias como no caso de uma enzima lítica que degrada peptídeoglicanos de *Pseudomona saeruginosa*, eficientemente (Russell *et al.*, 2011).

Os primeiros testes de expressão foram feitos de acordo com as instruções do fabricante, com temperatura de crescimento e expressão de 30° C e IPTG 0,4 mM, outras duas quantidades de IPTG também foram testadas (0,1 e 1,0 mM), pois excesso ou baixa indução pelo IPTG poderia representar uma menor eficiência na expressão. O meio de cultura também foi o mesmo utilizado para as outras cepas testadas até então, o Lúria-Bertani. O curioso nesse teste foi novamente a curva de crescimento das culturas, que quanto maior foi a quantidade de IPTG adicionada maior foi a regressão da cultura como mostrado no gráfico 4. A quantidade de peptídeo produzida nesse teste também foi pequena, ficando próxima a obtida para AD494 e Rosetta-Gami, que é uma banda de intensidade inferior as bandas de proteínas bacterianas quando visualizadas em SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. Essa quantidade de peptídeo expressa não é a esperada para quando se usa um vetor de expressão com um promotor forte como o T7 encontrado no pET-14b, onde a proteína recombinante chega a representar mais de 35% do total de proteínas da cultura (Liu *et al.*, 2012).

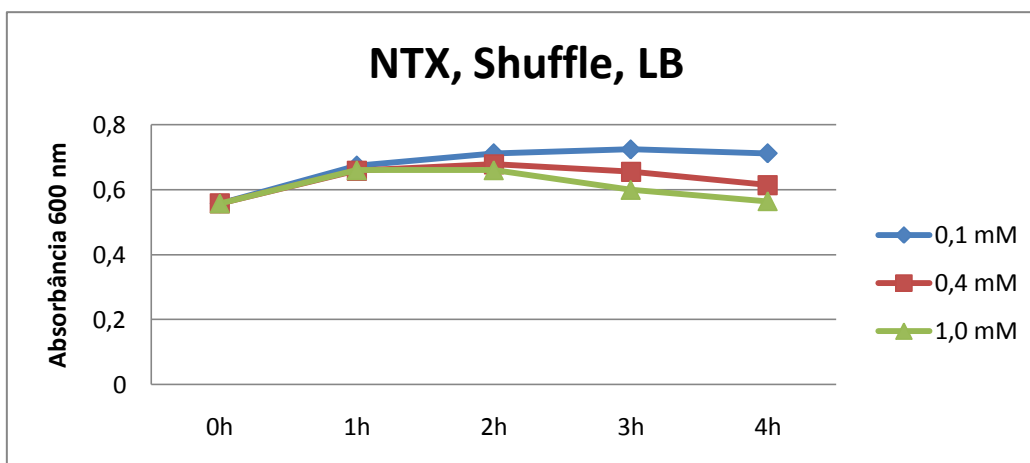


Gráfico 4. CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE SHUFFLE T7 EXPRESS lysY APÓS A ADIÇÃO DE IPTG.

Nesse caso observa-se uma grande mortandade de bactérias ao longo do tempo em decorrência da maior concentração de IPTG.

A fim de tentar melhorar as condições de crescimento das culturas de bactérias durante a expressão heteróloga, algumas mudanças foram realizadas. Como discutido em Sambrook, (2001), várias alterações podem ser feitas para se tentar obter as condições ótimas de expressão de proteínas recombinantes. Entre elas pode se citar as substituições de: cepas de expressão, vetor de expressão, meio de cultura e todas as variações da condição da cultura durante a expressão (temperatura, tempo, aeração, etc.). Como a troca de cepa de expressão já havia sido testada sem sucesso, outra alteração simples de ser realizada era a troca do meio de cultura. Dois novos meios foram testados, o primeiro, o triptona fosfato (2% triptona, 0,2% Na_2HPO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,8% NaCl , 1,5% extrato de levedura e 0,2% de glicose) como descrito por Moore *et al.*, (1993), que foi o melhor meio para a expressão de uma deaminase do fago T4; e o segundo, o 2xYT (extrato de levedura 1%, triptona 1,6%, cloreto de sódio 0,5% e glicose 0,5%), o qual foi utilizado com sucesso na expressão de um peptídeo antimicrobiano chamado adenoregulina (Cao *et al.*, 2005). Ambos os meios são suplementados com glicose para melhorar o crescimento bacteriano em relação ao L.B. Outra condição que foi alterada foi a redução da razão de meio de cultura/volume total do frasco de cultura utilizado para melhorar a condição de aeração durante o crescimento. Passou a ser utilizado um décimo do volume total do frasco com meio, ao invés da razão utilizada anteriormente de metade do volume total. Essas alterações melhoraram o crescimento da cultura como visto no Gráfico 5, a cultura atingiu quase o dobro do crescimento observado no teste anterior em apenas três horas após a indução. A variação do crescimento após a indução (Δ) foi de 0,650 para o meio 2xYT e para o triptona fosfato $\Delta = 0,810$. Enquanto que para a expressão em meio LB em três horas a $\Delta = 0,098$ (Gráfico 4)

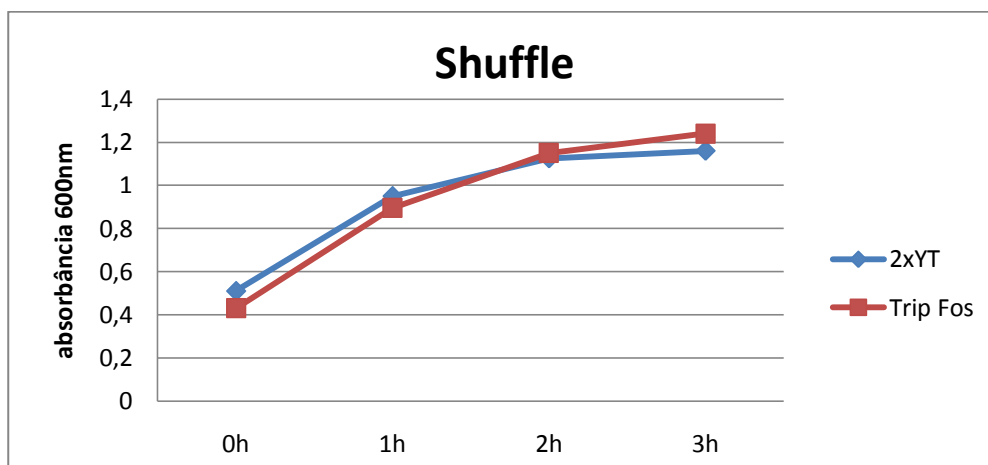


Gráfico 5. CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE SHUFFLE T7 EXPRESS lysY APÓS A ADIÇÃO DE IPTG EM MEIOS ENRIQUECIDOS.

Nesses testes foram utilizados 0,4 mM de IPTG para cada cultura e o crescimento final foi superior ao observado anteriormente.

A melhora no crescimento foi muito semelhante para os meios testados e, mesmo com o meio 2xYT possuindo 2,5 vezes mais glicose que o triptona fosfato, seu crescimento não foi superior. Como a glicose pode ser usada como uma fonte de carbono para o crescimento das bactérias seria possível que o crescimento no meio 2xYT fosse maior. Outra influência que a glicose no meio tem sobre a expressão de proteínas recombinantes é que ela auxilia na inibição da expressão basal de proteínas produzidas pelo sistema pET. A utilização da glicose não gera aumento de AMPc que por sua vez estimularia o promotor *lacUV5* que geraria o aumento de expressão da T7 RNA polimerase que transcreve o gene de interesse clonado no pET (Novagen pET system manual 11th edition). Esse cuidado é particularmente importante para a expressão de proteínas tóxicas para as bactérias ou para quando não se está utilizando uma cepa que não possua um vetor para repressão de expressão basal como o *plysS* ou *lysY*.

Para análise das expressões por SDS-PAGE, as amostras retiradas ao longo do tempo de expressão foram preparadas como descrito no item 3.9 da seção Materiais e Métodos. As amostras dos sobrenadantes foram feitas a partir do tempo final de indução, no qual as bactérias foram precipitadas por centrifugação a 6000 g

por 7 min. O sedimento bacteriano foi então ressuspendido no tampão de ligação à resina e lisado por prensa mecânica. O lisado obtido foi então centrifugado por 30 min a 9000 g para separar a fração do sobrenadante, a qual seria enriquecida de material solúvel de preferência, como a toxina recombinante de interesse, do pellet com restos de sedimento insolúvel. Quando os resultados foram analisados por SDS-PAGE e coradas com azul brilhante de Coomassie, a expressão no meio triptona fosfato aparentou ser um pouco superior a do 2xYT (Fig. 16 e 17). Também como o crescimento da cultura foi levemente superior para o meio triptona fosfato esse meio foi escolhido para ser utilizado nas próximas etapas, nas condições descritas no item 3.7 da seção Materiais e Métodos.

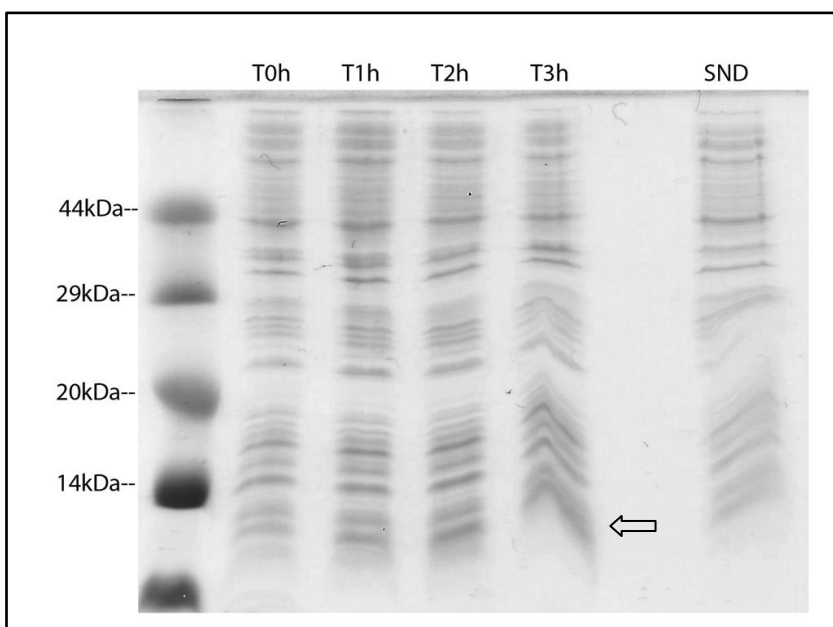


Figura 16: SDS-PAGE DO TESTE DE MINIEXPRESSÃO EM MEIO 2xYT.

Gel mostrando o teste de expressão induzida com 0,4 mM de IPTG à 30°C, em todos os tempos desde 0h até 3h e as proteínas presentes no sobrenadante (SND). É possível identificar um pequeno aumento na quantidade de proteína recombinante (~10 kDa) entre os tempos 0 e 3h. Seta indica a banda na altura referente à proteína recombinante. Gel SDS-PAGE 20% em condições redutoras.

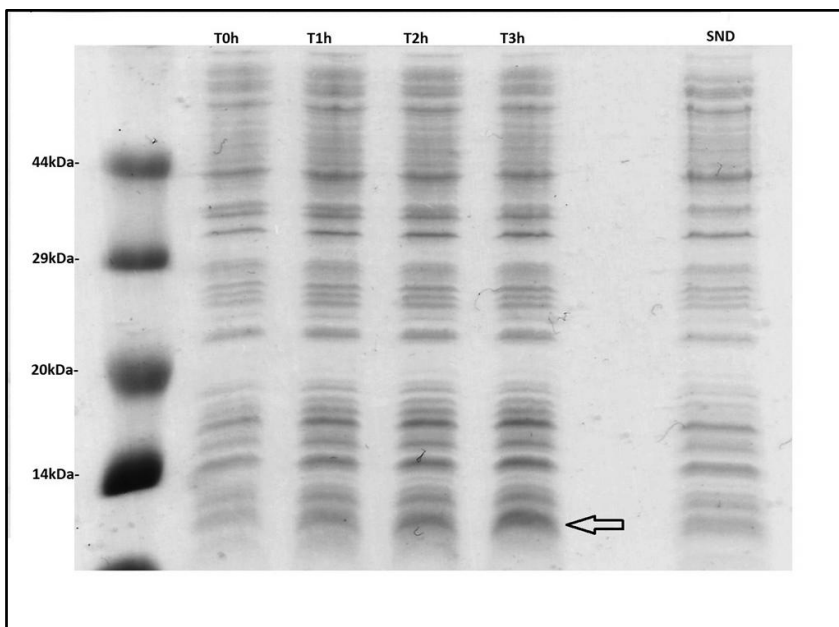


Figura 17: SDS-PAGE DO TESTE DE MINIEXPRESSÃO EM MEIO TRIPTONA FOSFATO.

Gel mostrando o teste de expressão induzida com 0,4 mM de IPTG à 30°C, em todos os tempos desde 0h até 3h e as proteínas presentes no sobrenadante (SND). É possível identificar um pequeno aumento na quantidade de proteína recombinante (~10 kDa) entre os tempos 0 e 3h. Seta indica a banda na altura referente à proteína recombinante. Gel SDS-PAGE 20% em condições redutoras.

A fim de comprovar que a banda na altura de ~10 kDa realmente referia-se ao peptídeo de interesse, foi realizado um ensaio de Western Blotting (W.B.), onde as amostras do tempo antes da indução e após 3h de indução com 0,4mM de IPTG foram corridas em gel de poliacrilamida 20% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Como anticorpo primário, utilizou-se um anticorpo que reconhece a etiqueta de histidina conferida pelo vetor ao peptídeo recombinante (Fig. 18). O resultado do W.B. foi positivo, o peptídeo foi expresso na condição escolhida. A imagem do W.B. do tempo antes da indução revela que não há expressão antes da adição de IPTG.

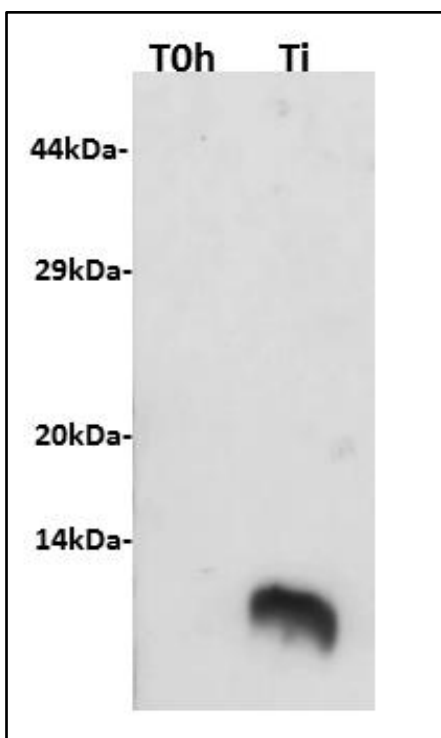


Figura 18: WESTERN BLOTTING DA EXPRESSÃO EM SHUFFLE.

O W.B. foi realizado a partir das amostras coletadas nos testes de expressão. T0h) amostra coletada da cultura antes da indução de expressão por IPTG que revela que não houve expressão basal do peptídeo recombinante. Ti) amostra coletada ao final do processo de expressão, 3 horas após a indução, a banda se encontra na região esperada de ~10 kDa. W.B. feito a partir de gel SDS-PAGE 20% em condições redutoras.

Tendo o peptídeo sido expresso mesmo em baixas quantidades, mas ainda superior às obtidas nos outros testes, seguiu-se para a próxima etapa que é a purificação com resina de Ni^{2+} NTA agarose. Os primeiros testes de purificação foram feitos nas condições padrão segundo o fabricante da resina. Sendo a ligação do peptídeo em tampão nativo 1x com 10 mM de imidazol, a lavagem e eluição como descrito no item 3.11 da seção Materiais e Métodos. No entanto, a purificação não foi eficiente, uma vez que o produto eluído apresentava diversas bandas e não apenas uma como o esperado para a purificação (Fig. 19). Como intuito de avaliar se as diferentes bandas observadas no produto purificado eram oligômeros, passíveis de serem formados em função das possibilidades de pontes dissulfeto ou mesmo de interações hidrofóbicas estáveis entre cadeias polipeptídicas, foi realizado um W.B.. Este teste mostrou apenas a presença de uma pequena porcentagem de dímeros apenas (Fig. 20) mostrando que as outras bandas vistas no gel corado com Coomassie realmente eram contaminantes. A fim de obter um produto mais puro uma nova purificação foi realizada em condições mais extrínsecas para tentar reduzir a ligação inespecífica de proteínas da bactéria à resina. Para tal, foram utilizados os tampões de ligação e lavagem da resina com 20

e 40 mM de imidazol respectivamente. O objetivo é que o imidazol compita com a etiqueta de histidina do peptídeo recombinante pelo níquel da resina, de modo que as proteínas da bactéria que estejam ligadas de maneira mais fraca tenham menor afinidade em relação ao ligante em excesso imidazol. Essa exstringência ajudou a reduzir os contaminantes, pois o produto eluído apresentava menos bandas de proteínas inespecíficas em gel SDS-PAGE (dado não mostrado) do que quando o peptídeo foi purificado na condição padrão, mas ainda assim não totalmente puro.

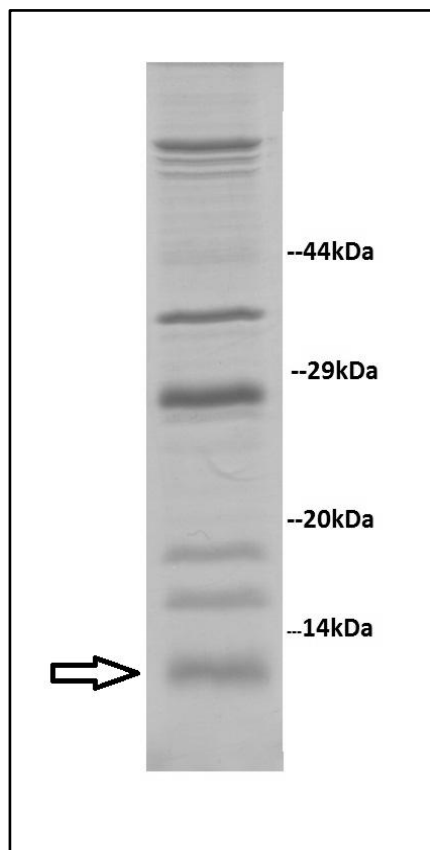


Figura 19. SDS-PAGE DO PRODUTO ELUIDO NA PURIFICAÇÃO PADRÃO DA RESINA Ni^{2+} NTA AGAROSE.

A seta indica a banda referente ao peptídeo recombinante. As outras bandas são proteínas bacterianas que ficaram adsorvidas na resina durante o processo de purificação. Gel SDS-PAGE 20% em condições redutoras.

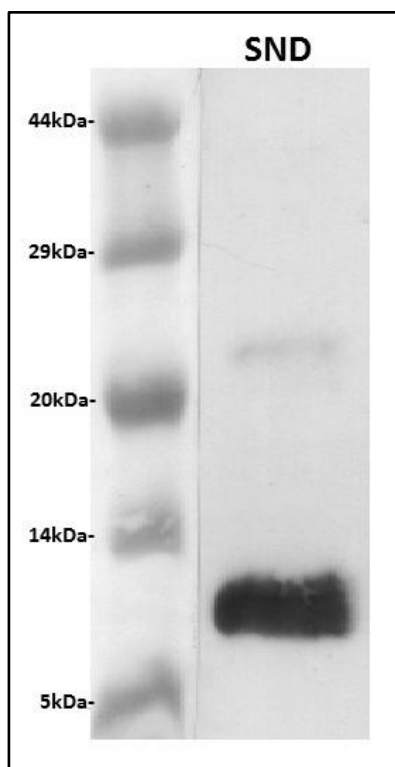


Figura 20. WESTERN BLOTTING DO PRODUTO PURIFICADO.

Foi utilizado anticorpo primário que reconhece a etiqueta de histidina. Observa-se que a maior parte do peptídeo encontra-se na sua forma monomérica $\sim 10\text{kDa}$, porém há uma pequena banda referente a um possível dímero $\sim 20\text{kDa}$. W.B. feito a partir de gel SDS-PAGE 20% em condições redutoras.

Outras purificações foram realizadas na condição extrínseca, porém sempre havia proteínas contaminantes no eluato da resina. Como os contaminantes estavam sempre presentes nos produtos purificados, levantamos a possibilidade desses contaminantes estarem se associando à proteína de interesse através de pontes dissulfeto e por isso não seriam eliminados durante o processo de lavagem da resina de purificação. Para testar essa hipótese uma amostra do purificado foi analisada em SDS-PAGE gradiente 7,5-20% não redutor para visualizar a existência de possíveis agregados. Quando o gel foi analisado por azul de Coomassie (Fig. 21A) foi claramente visível a diferença no padrão de bandas entre as amostras, indicando que os contaminantes estavam sim fazendo pontes dissulfeto intercadeias. Faltava saber se essas bandas e o arrastado de proteínas observado na amostra sem agente redutor continham a proteína recombinante, para isso foi feito outro W.B. (Fig. 21B) como descrito anteriormente. O resultado foi muito interessante, pois mostra que o peptídeo recombinante estava fazendo ligação cruzada com ele mesmo e com diferentes proteínas da bactéria através de pontes dissulfeto. Naturalmente o citoplasma bacteriano não permite a formação de pontes dissulfetos estáveis necessárias para a estrutura de proteínas, devido à presença de

redutases como a tioredoxina e glutaredoxina. Cepas deficientes nessas redutases permitem a formação de pontes dissulfeto em seus citoplasmas, porém o crescimento da cultura é muito desfavorecido. O tempo de duplicação das células deficientes é em torno de 300 min e necessitam de um agente redutor como DTT para crescerem, contra os 30 min de bactérias não deficientes (Bessette *et al.*, 1999). A cepa Shuffle T7 express lysY é deficiente nessas duas redutases, mas para não afetar o crescimento ela possui uma ponte dissulfeto isomerase de periplasma (DsbC) que foi alterada para ser retida no citoplasma o que também colabora com o correto dobramento das proteínas, segundo o fabricante. É possível que essa maquinaria responsável por permitir a formação das pontes dissulfeto que seriam necessárias para a estrutura da toxina seja responsável pela formação dessas pontes dissulfeto entre a toxina recombinante e proteínas citoplasmáticas. Talvez devido a essas ligações intercadeias é que tenha sido observado o crescimento dificultado das culturas após a indução da expressão como mostrado nos gráficos 1, 2, 3 e 4. É possível que esses agregados entre proteínas bacterianas e peptídeo recombinante estejam afetando o metabolismo normal das bactérias dificultando o crescimento.

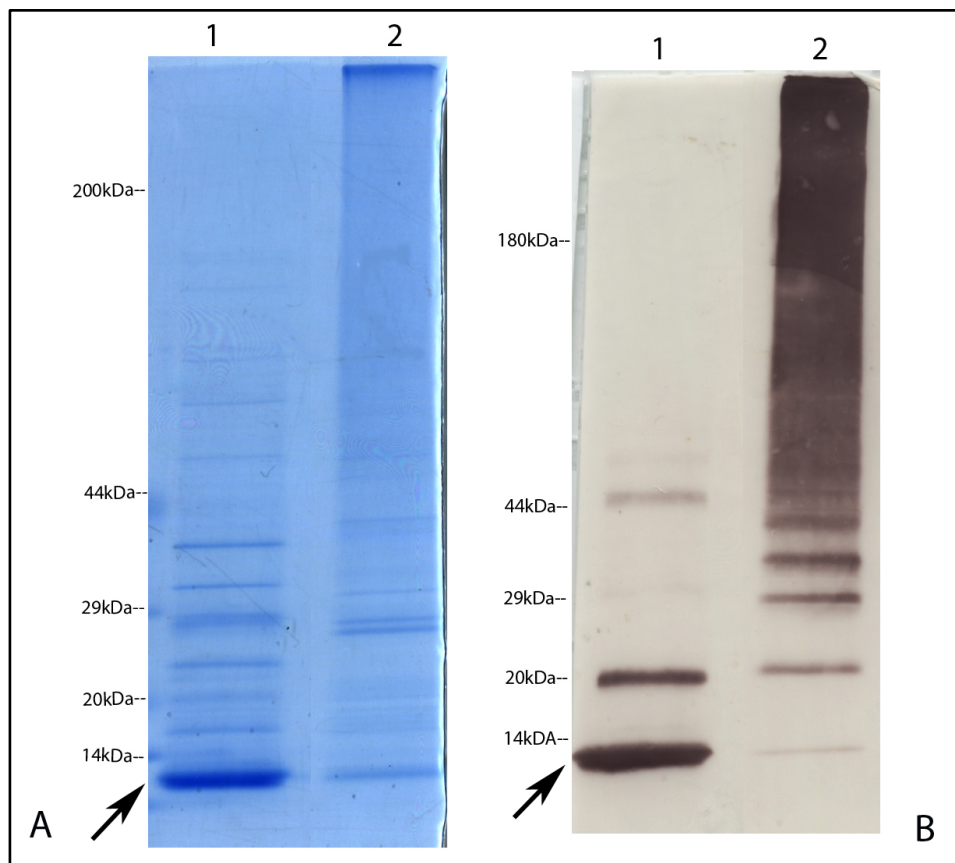


Figura 21. GEL GRADIENTE SDS-PAGE 7,5-20% DO PURIFICADO EM CONDIÇÕES REDUTORAS E NÃO REDUTORAS.

A) Coluna 1, amostra com tampão redutor corada com azul de coomassie onde a banda mais intensa corresponde a forma monomérica do peptídeo (seta). Coluna 2, amostra sem tampão redutor onde se observa um grande arrastado de proteínas de alta até baixa massa molecular. B) Western Blot das mesmas amostras de "A". Coluna 1 mostra que nem todas as proteínas observadas na coluna 1 de "A" eram peptídeo recombinante. Coluna 2 mostra o grande agregado de proteínas e peptídeo recombinante presente no produto purificado. Seta indica o monômero do peptídeo recombinante, usando anticorpo primário que reconhece a etiqueta de histidina.

Um novo teste de purificação foi realizado desta vez tentando quebrar as pontes dissulfeto presentes no sobrenadante do lisado bacteriano com agente redutor. Para isso foi adicionado 20mM de β -mercaptoetanol no sobrenadante da cultura para reduzir as pontes dissulfeto. Essa quantidade de agente redutor foi escolhida, pois é a quantidade máxima que a resina suporta sem ocorrer à redução do níquel segundo o manual do fabricante. Pois com a redução do níquel a

capacidade dele interagir com a etiqueta de histidina do peptídeo seria reduzida ou anulada.

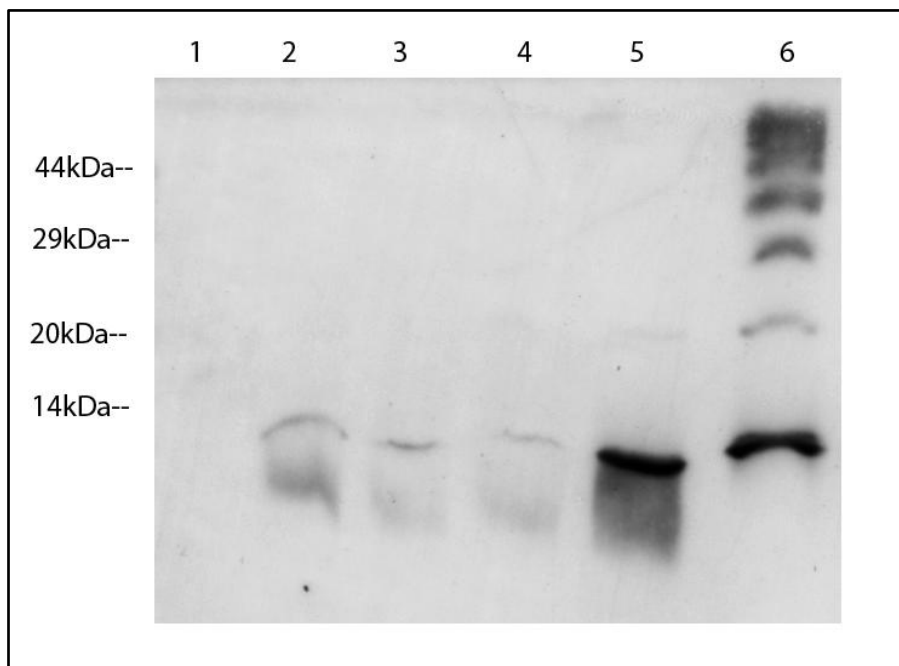


Figura. 22. PURIFICAÇÃO DA NTX EM CONDIÇÕES REDUTORAS.

1) T0h antes da adição de IPTG, mostrando que não houve expressão basal. 2) Ti total de peptídeo expresso após o tempo de indução. 3) Amostra do sobrenadante após a lise das bactérias. 4) peptídeos que não se ligaram à resina após incubação. 5) Peptídeos purificados e corridos em condição redutora, onde a banda mais intensa corresponde ao monômero. 6) Peptídeos purificados e corridos em condições não redutoras, onde há uma maior porcentagem de monômeros, mas continuam presentes os oligômeros e complexos com proteínas bacterianas.

As amostras dessa purificação foram corridas em SDS-PAGE 20% e coradas com azul brilhante de Coomassie, que mostrou que mesmo com a adição de agente redutor ainda havia proteínas contaminantes no produto da purificação (dado não mostrado). E novamente para avaliar a presença de oligômeros foi realizado um W.B. como descrito anteriormente (Fig. 22). A diferença mais significativa dessa purificação para as anteriores foi à presença de uma banda de maior intensidade referente ao monômero (~10 kDa) na amostra sem β -mercaptoetanol no tampão de amostra (coluna 6 da figura 22 comparada com a coluna 2 da figura 21B). Isso

provavelmente deve-se ao fato do β -mercaptoetanol ter reduzido algumas pontes dissulfeto inespecíficas entre monômeros e proteínas bacterianas. Deixando mais monômeros livres na solução de proteína purificada. Porém a quantidade de agente redutor utilizada não foi suficiente para reduzir todas as pontes dissulfetos inespecíficas o que acarretou na presença de uma grande quantidade de agregados, referentes a dímeros, trímeros e ainda os complexos com outras proteínas.

Devido às complicações para obter um alto nível de pureza durante a purificação uma nova abordagem foi de expressão foi tentada. Para isso o cDNA codificante da NTX foi clonado no vetor de expressão pET-32a esse vetor confere a proteína recombinante uma tioredoxina como proteína de fusão além da etiqueta de histidina para purificação na porção N-terminal. Esse vetor já foi utilizado para expressão de diferentes proteínas e peptídeos e é usado porque favorece o dobramento correto de algumas proteínas contendo pontes dissulfeto e holotoxinas (Tu *et al.*, 2009; Yifeng, 2012). Para a clonagem foram desenhados dois novos oligonucleotídeos iniciadores, sendo o sense 5'- AATGGATCCGCTGTTGTATCAA -3' com sítio de restrição (sublinhado) para *Bam*HI e o anti-sense 5'- AATCTCGAGTCAGTTGGTGATTCC -3' com sítio de restrição (sublinhado) para *Xho*I. A clonagem foi realizada com sucesso e para a etapa de expressão foi optado por manter as condições utilizadas para a expressão com pET-14b, sendo a cepa Shuffle Express T7 lysY em meio triptona fosfato a 30°C. Foram avaliadas diferentes concentrações de IPTG para indução, para isso foram usadas três concentrações: 0,1; 0,4 e 1,0 mM. Como mostrado no gráfico 6 o crescimento das três culturas foi muito bom se comparados com as outras expressões com o pET-14b, uma vez que a D.O₆₀₀ passou de 1,6 em todas as culturas. Já a análise da expressão por SDS-PAGE (figura 23) mostrou que a maior quantidade expressa de proteína foi com 0,4 mM de IPTG, porém a quantidade de proteína expressa nos três testes foi bem superior a todas as expressões anteriores em pET-14b. Entretanto, o inconveniente para a expressão em pET-32a foi que, para as três concentrações testadas, a construção com a proteína de fusão ficou insolúvel em corpos de inclusão.

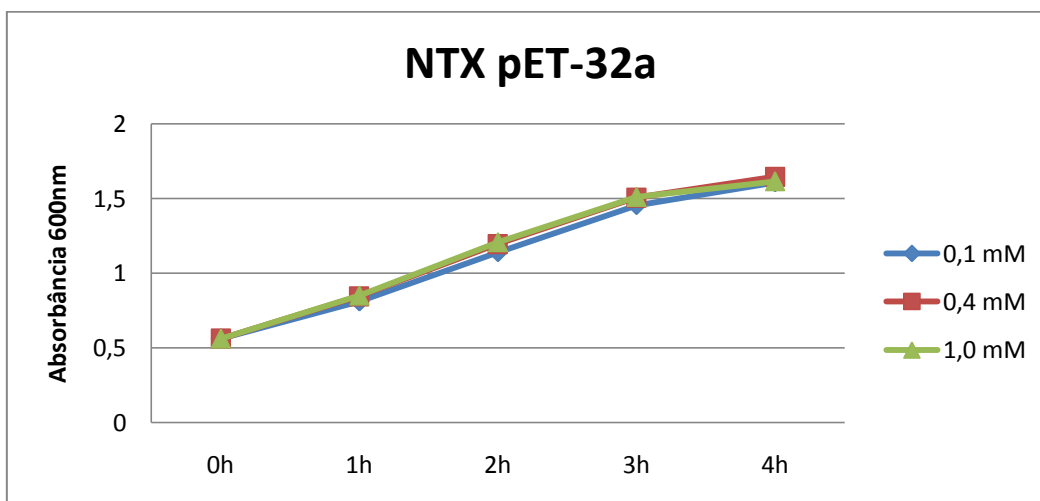


Gráfico 6. CRESCIMENTO DA CULTURA BACTERIANA DE SHUFFLE T7 EXPRESS lysY COM VETOR pET-32a APÓS ADIÇÃO DE IPTG.

O crescimento das três culturas foi muito parecido e superior aos crescimentos observados para as culturas que foram transformadas com pET-14b. Foi utilizado o meio triptona fosfato nesse teste.

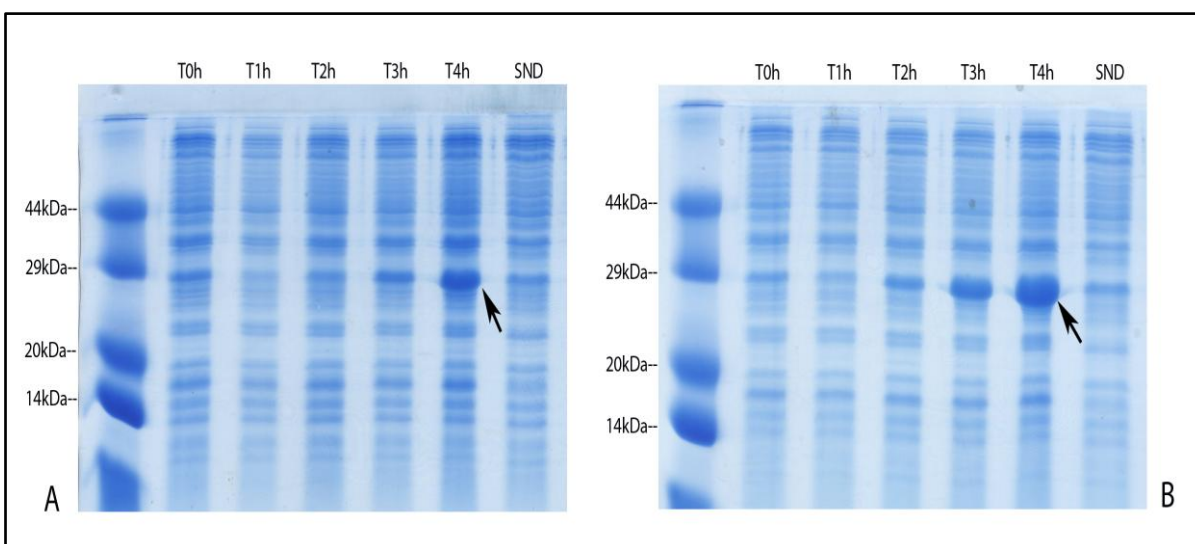


Figura 23. SDS-PAGE DAS EXPRESSÕES DE NTX EM SHUFFLE T7 EXPRESS lysY UTILIZANDO O VETOR pET-32a.

A) Mostra a expressão da cultura induzida com 0,1 mM de IPTG. B) Mostra a expressão da cultura induzida com 0,4 mM de IPTG. Para ambas as imagens: T0h- tempo antes da adição de IPTG. T1h, T2h, T3h e T4h amostras coletadas de hora em hora após a indução, onde se observa o aumento da quantidade de proteína recombinante ao longo do tempo em aproximadamente 27 kDa (setas). SND- É a fração solúvel do lisado bacteriano mostrado que a proteína ficou insolúvel após 4h de indução. O gel da indução com 1,0 mM de IPTG não é mostrado, mas a quantidade de proteína recombinante produzida foi um pouco inferior a produzida com 0,4 mM de IPTG. Gel SDS-PAGE 20% em condições redutoras.

Apesar de algumas dificuldades encontradas com técnicas de biologia molecular na parte de clonagem da sequência nucleotídica em pET-14 que fizeram com que esse trabalho demorasse mais tempo que o esperado, o cDNA de interesse foi subclonado com sucesso no vetor de expressão. O sequenciamento confirmou que a sequência obtida não apresentava nenhuma troca de nucleotídeo e que a fase de leitura estava correta. As análises por bioinformática forneceram informações relevantes sobre características do peptídeo como massa molecular e a possível existência de cinco pontes dissulfeto. A parte de expressão do peptídeo recombinante com o pET-14b até o momento não estão sendo satisfatória e para o pET-32a a quantidade expressa foi satisfatória porém de forma insolúvel. A purificação ainda não está padronizada de maneira eficiente, diferentes abordagens para lavagem da resina serão testadas com o intuito de obter um produto com alto grau de pureza. Ainda há a possibilidade de se realizar um “refolding” da proteína expressa em pET-32a para solubilização e purificação. Ainda há a possibilidade de se tentar um novo vetor o pET-SUMO, que confere a proteína recombinante uma outra proteína de fusão relacionada a ubiquitina prometendo uma maior solubilidade. Essa proteína de fusão pode ainda ser clivada com o uso de uma protease específica chamada de SUMO (ULP-1) que cliva na sua porção carboxi-terminal, liberando a proteína recombinante totalmente e sem nenhuma outra etiqueta associada.

Assim que o peptídeo recombinante seja obtido puro ele poderá ser testado quanto à atividade biológica. Para isto testes “*in vivo*” quanto à letalidade da toxina serão realizados testes de microinjeção em larvas de inseto e insetos adultos a fim calcular a DL_{50} da toxina. Para avaliar se a toxina possui atividade sobre mamíferos, serão feitas injeções intraperitoneais de diferentes concentrações em camundongos suíços. Para testes “*in vitro*” serão realizados testes em células de inseto em cultura. Como intuito de realizar a publicação de um artigo científico.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- A NTX é uma proteína pertencente à família das notinas
- Através de análises de bioinformática previu-se a existência de pontes dissulfeto na sequência da NTX
- A subclonagem em pET-14b foi mais complicada que o esperado, e a obtenção de uma construção pET-14b/NTX foi difícil, o que acabou atrasando o andamento do projeto.
- O fato de possuir pontes dissulfeto exigiu a utilização de condições especiais de expressão
- Os primeiros testes de expressão com a cepa AD494 em meio Luria-Bertani, não renderam como o esperado, mesmo quando a quantidade de indutor foi aumentada.
- A segunda cepa de expressão testada, Rosetta-gami, em meio Luria-Bertani também produziu uma pequena massa de peptídeo recombinante como a AD494, porém de forma insolúvel em corpos de inclusão.
- A utilização da cepa Shuffle T7 expresslysY ainda em meio Luria-bertani mostrou uma baixa produção de peptídeo recombinante. Uma dificuldade no crescimento da cultura seguida por uma regressão proporcional ao aumento de agente indutor.
- A utilização de meios de cultura mais ricos em triptona, extrato de levedura e suplementados com glicose mostrou-se mais eficiente que o Luria-Bertani na produção do peptídeo recombinante.
- A purificação desse peptídeo rico em cisteína também aparenta ser mais complicada, uma vez que os protocolos padrões não foram eficientes.
- A dificuldade em purificá-lo esta nas possíveis interações entre o peptídeo recombinante e proteínas citoplasmáticas das bactérias por pontes dissulfeto inespecíficas.
- A subclonagem em pET-32a foi realizada rapidamente e com sucesso.
- A expressão em pET-32a foi bem superior a obtida no pET-14b, porém o peptídeo estava insolúvel.

- A utilização de novos vetores de expressão como pET-SUMO, parece ser promissora para os problemas de rendimento e talvez solubilidade.
- Pelo fato do peptídeo pertencer à família das notinas, sua atividade biológica pode ser interessante e diversificada, desde inseticida à marcador tumoral de mamíferos.
- Completar os objetivos propostos inicialmente já no começo do doutorado.

REFERÊNCIAS

ALGREN, D. A.; LOWRY, J. A.; WASSERMAN, G. S. Pearls About Loxoscelism. **Annals of Emergency Medicine**, v. 57, n. 4, p. 419-420, 2011. ISSN 0196-0644.

APPEL, M. H.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **ISJ**, v. 2, p. 152-8, 2005.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 2, p. 167-78, Feb 2008. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking).

AZEVEDO CALDERON, L. D.; SILVA, A. D.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 29-49, 2010. ISSN 0939-4451.

BESSETTE, P. H.; ÅSLUND, F.; BECKWITH, J.; GEORGIU, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 13703-13708, November 23, 1999 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking).

BRAVO, M.; PURATIC, O.; BEHN, C.; FARDELLA, C.; CONTRERAS, A. [Hemolysis induced by *Loxosceles laeta* venom. In vitro experience]. **Rev Med Chil**, v. 121, n. 1, p. 16-20, Jan 1993.

BUCARETCHI, F.; DE CAPITANI, E. M.; HYSLOP, S.; SUTTI, R.; ROCHA-E-SILVA, T. A.; BERTANI, R. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles anomala*. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 48, n. 7, p. 764-5, Aug 2010. ISSN 1556-9519 (Electronic) 1556-3650 (Linking).

BUCHERL, W. As aranhas. In Invertebrados. **Edtart, São Paulo**, v. 1ª ed., 1972.

CAO, W.; ZHOU, Y.; MA, Y.; LUO, Q.; WEI, D. Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 404-410, 2005. ISSN 1046-5928.

CERONI, A. P., A. VULLO AND P. FRASCONI. . DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server. **Nucleic Acids Research**, v. 34(Web Server issue, p. W177--W181, 2006.

CHAIM, O. M., DILZA TREVISAN-SILVA, DANIELE CHAVES-MOREIRA, ANA CAROLINA M. WILLE, VALÉRIA PEREIRA FERRER, FERNANDO HITOMI MATSUBARA, OLDEMIR CARLOS MANGILI, RAFAEL BERTONI DA SILVEIRA, LUIZA HELENA GREMSKI, WALDEMIRO GREMSKI, ANDREA SENFF-RIBEIRO, SILVIO SANCHES VEIGA. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **toxins**, v. 3, n. 3, p. 309–344, 2011.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 1, p. 64-77, Feb 15 2006.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F. N.; FOGAÇA, R. T. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2529-2540, 2011. ISSN 1097-4644.

CHEEK, S.; KRISHNA, S. S.; GRISHIN, N. V. Structural classification of small, disulfide-rich protein domains. **J Mol Biol**, v. 359, n. 1, p. 215-37, May 26 2006. ISSN 0022-2836 (Print)
0022-2836 (Linking).

CORZO, G.; ESCOUBAS, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 11, p. 2409-26, Nov 2003. ISSN 1420-682X (Print)
1420-682X (Linking).

CORZO, G.; GILLES, N.; SATAKE, H.; VILLEGAS, E.; DAI, L.; NAKAJIMA, T.; HAUPT, J. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. **FEBS Letters**, v. 547, n. 1-3, p. 43-50, 2003. ISSN 0014-5793.

CRAIK, D.; MYLNE, J.; DALY, N. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 1, p. 9-16, 2010. ISSN 1420-682X.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; BOND, T.; WAINE, C. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1327-1336, 1999. ISSN 0022-2836.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, Dec 1 2004. ISSN 0041-0101 (Print)
0041-0101 (Linking).

DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 758-68, May 2007a.

DA SILVEIRA, R. B.; DOS SANTOS FILHO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VON DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 815-22, Jun 2002.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289-300, Mar 2007b.

DA SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem J**, v. 406, n. 2, p. 355-63, Sep 1 2007c.

DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Bioactive cystine knot proteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 362-368, Jun 2011a. ISSN 1367-5931.

DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Bioactive cystine knot proteins. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, n. 3, p. 362-8, Jun 2011b. ISSN 1879-0402 (Electronic) 1367-5931 (Linking).

DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAUJO, S. C.; GABRIEL DE, M. Y.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273-80, Sep 1 2004. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

DE GIUSEPPE, P. O.; ULLAH, A.; SILVA, D. T.; GREMSKI, L. H.; WILLE, A. C.; CHAVES MOREIRA, D.; RIBEIRO, A. S.; CHAIM, O. M.; MURAKAMI, M. T.; VEIGA, S. S.; ARNI, R. K. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 409, n. 4, p. 622-7, Jun 17 2011. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking).

DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invertebrate Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 17-30, 2007. ISSN 1354-2516.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 893-907, 2000. ISSN 0300-9084.

ESPINO-SOLIS, G. P.; ESTRADA, G.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; VILLEGAS, E.; ZAMUDIO, F.; CESTELE, S.; POSSANI, L. D.; CORZO, G. Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. **Toxicon**, Feb 15 ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

ESTRADA, G.; GARCIA, B. I.; SCHIAVON, E.; ORTIZ, E.; CESTELE, S.; WANKE, E.; POSSANI, L. D.; CORZO, G. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin Cssl: Heterologous expression and proper folding in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1770, n. 8, p. 1161-1168, 2007a. ISSN 0304-4165.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Nat Prod Rep**, v. 24, n. 1, p. 145-61, Feb 2007b. ISSN 0265-0568 (Print) 0265-0568 (Linking).

FABRO, J. S.; STERKEL, M.; CAPRIOTTI, N.; MOUGABURE-CUETO, G. N.; GERMANO, M. N.; RIVERA-POMAR, R.; ONS, S. Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagasâ€™ disease. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 0, 2011. ISSN 1567-1348.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, Jul 1998.

FITCHES, E.; EDWARDS, M. G.; MEE, C.; GRISHIN, E.; GATEHOUSE, A. M. R.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 1, p. 61-71, 2004. ISSN 0022-1910.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261-267, 1992a. ISSN 0002-9629.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, Oct 1992b.

GACHET, Y.; TOURNIER, S.; LEE, M.; LAZARIS-KARATZAS, A.; POULTON, T.; BOMMER, U. A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 8, p. 1257-1271, April 15, 1999 1999.

GARCÍA-FRUITÓS, E.; SABATE, R.; DE GROOT, N. S.; VILLAVERDE, A.; VENTURA, S. Biological role of bacterial inclusion bodies: a model for amyloid aggregation. **FEBS Journal**, v. 278, n. 14, p. 2419-2427, 2011. ISSN 1742-4658.

GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. **Peptide Science**, v. 47, n. 6, p. 479-491, 1998. ISSN 1097-0282.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. E.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIRCH, A.; WALKER, J. M. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server
The Proteomics Protocols Handbook. In: (Ed.): Humana Press, 2005. p.571-607. ISBN 978-1-59259-890-8.

GATTI-LAFRANCONI, P.; NATALELLO, A.; AMI, D.; DOGLIA, S. M.; LOTTI, M. Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. **FEBS Journal**, v. 278, n. 14, p. 2408-2418, 2011. ISSN 1742-4658.

GERTSCH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 136, p. 117-174, 1967.

GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M. A. Phoneutria nigriventer venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 5-6, p. 579-88, Dec 2002. ISSN 0272-4340 (Print) 0272-4340 (Linking).

GOTO, L. S.; BELTRAMINI, L. M.; MORAES, D. I. D.; MOREIRA, R. A.; DE ARAÚJO, A. P. U. Abrus pulchellus type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain. **Protein Expression and Purification**, v. 31, n. 1, p. 12-18, 2003. ISSN 1046-5928.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 12, p. 2403-16, Dec 2010. ISSN 1742-2051 (Electronic) 1742-2051 (Linking).

HARLOW, E.; LANE, D. Cold Spring Harbor Laboratory Press. **Using antibodies: A laboratory manual**, 1988a.

HARLOW, E.; LANE, D. Immunoblotting. **Antibodies: a laboratory manual**, p. 471-510, 1988b.

HEITZ, A.; AVRUTINA, O.; LE-NGUYEN, D.; DIEDERICHSEN, U.; HERNANDEZ, J. F.; GRACY, J.; KOLMAR, H.; CHICHE, L. Knottin cyclization: impact on structure and dynamics. **BMC Struct Biol**, v. 8, p. 54, 2008. ISSN 1472-6807 (Electronic) 1472-6807 (Linking).

HEITZ, A.; HERNANDEZ, J.-F. O.; GAGNON, J.; HONG, T. T.; PHAM, T. T. N. C. U.; NGUYEN, T. M.; LE-NGUYEN, D.; CHICHE, L. Solution Structure of the Squash

Trypsin Inhibitor MCoTI-II. A New Family for Cyclic Knottins. **Biochemistry**, v. 40, n. 27, p. 7973-7983, 2012/02/08 2001. ISSN 0006-2960.

HENRIQUES, S. N. T.; CRAIK, D. J. Cyclotides as templates in drug design. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 1-2, p. 57-64, 2010. ISSN 1359-6446.

HERNANDEZ-CAMPUZANO, B.; SUAREZ, R. N.; LINA, L.; HERNÁNDEZ, V.; VILLEGAS, E.; CORZO, G.; ITURRIAGA, G. Expression of a spider venom peptide in transgenic tobacco confers insect resistance. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 122-128, 2009. ISSN 0041-0101.

IRELAND, D. C.; CLARK, R. J.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Isolation, Sequencing, and Structure-Activity Relationships of Cyclotides. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 9, p. 1610-1622, 2011/11/25 2010. ISSN 0163-3864.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **The Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039-2047, 2011. ISSN 0140-6736.

IYER, S.; ACHARYA, K. R. Tying the knot: The cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. **FEBS Journal**, v. 278, n. 22, p. 4304-4322, 2011. ISSN 1742-4658.

JIANG, S. A.; CAMPUSANO, J. M.; SU, H.; O'DOWD, D. K. Drosophila Mushroom Body Kenyon Cells Generate Spontaneous Calcium Transients Mediated by PLTX-Sensitive Calcium Channels. **Journal of Neurophysiology**, v. 94, n. 1, p. 491-500, July 1, 2005 2005.

KIM, S.; MOHAMEDALI, K. A.; CHEUNG, L. H.; ROSENBLUM, M. G. Overexpression of biologically active VEGF121 fusion proteins in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 3, p. 638-647, 2007. ISSN 0168-1656.

KIMURA, R. H.; CHENG, Z.; GAMBHIR, S. S.; COCHRAN, J. R. Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. **Cancer Res**, v. 69, n. 6, p. 2435-42, Mar 15 2009. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking).

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469-1484, 2011.

KING, G. F.; TEDFORD, H. W.; MAGGIO, F. STRUCTURE AND FUNCTION OF INSECTICIDAL NEUROTOXINS FROM AUSTRALIAN FUNNEL-WEB SPIDERS. **Toxin Reviews**, v. 21, n. 4, p. 361-389, 2002.

KOLOSOF, A.; GOODCHILD, C. S.; COOKE, I. CNSB004 (Leconotide) Causes Antihyperalgesia Without Side Effects When Given Intravenously: A Comparison with Ziconotide in a Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain. **Pain Medicine**, v. 11, n. 2, p. 262-273, 2010. ISSN 1526-4637.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1722-36, Nov-Dec 2008. ISSN 1638-6183 (Electronic) 0300-9084 (Linking).

LAMARK, T.; INGEBRIGTSEN, M.; BJÄRNSTAD, C.; MELKKO, T.; MOLLNES, T. E.; NIELSEN, E. W. Expression of Active Human C1 Inhibitor Serpin Domain in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 22, n. 2, p. 349-358, 2001. ISSN 1046-5928.

LEE, C. W.; KIM, S.; ROH, S. H.; ENDOH, H.; KODERA, Y.; MAEDA, T.; KOHNO, T.; WANG, J. M.; SWARTZ, K. J.; KIM, J. I. Solution structure and functional characterization of SGTx1, a modifier of Kv2.1 channel gating. **Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 890-7, Feb 3 2004. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking).

LEE, S. Y.; MACKINNON, R. A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 232-5, Jul 8 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).

LI, D.; XIAO, Y.; HU, W.; XIE, J.; BOSMANS, F.; TYTGAT, J.; LIANG, S. Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider Selenocosmia hainana. **FEBS Letters**, v. 555, n. 3, p. 616-622, 2003. ISSN 0014-5793.

LIU, X.; CHEN, Y.; WU, X.; LI, H.; JIANG, C.; TIAN, H.; TANG, L.; WANG, D.; YU, T.; LI, X. SUMO fusion system facilitates soluble expression and high production of bioactive human fibroblast growth factor 23 (FGF23). **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-9, 2012. ISSN 0175-7598.

MALAQUE, C. Aspectos clínicos e epidemiológicos do loxoscelismo em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, p. 139-143, 2002.

MALAQUE, C. M.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L.; CONDE, M. R.; NOVAES, C. T.; RISK, J. Y.; FRANCA, F. O.; DE MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664-71, Dec 1 2011. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

MAMELAK, A. N.; JACOBY, D. B. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, n. 2, p. 175-186, 2007.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. [Loxosceles Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 4, p. 331-5, Jul-Aug 2005. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682 (Linking).

MARTINEZ-VARGAS, Z. Loxoscelismo, un problema de salud en el Peru. **Organización panamericana de la salud**, v. 103, n. 4, p. 378-386, 1987.

MCDONALD, N. Q.; HENDRICKSON, W. A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 421-424, 1993. ISSN 0092-8674.

MOORE, J. T.; UPPAL, A.; MALEY, F.; MALEY, G. F. Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. **Protein Expr Purif**, v. 4, n. 2, p. 160-3, Apr 1993. ISSN 1046-5928 (Print) 1046-5928 (Linking).

NICHOLSON, G. M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 490-512, Mar 15 2007. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

NWANE, P. J. E., MOUHAMADOU CHOUAÏBOU , JEAN CLAUDE TOTO, RÉMY MIMPFOUNDI, AND FRÉDÉRIC SIMARD. Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.s populations in. **BMC Res Notes**, v. 4, 2011.

PLATNICK, N. I. The World Spider Catalog, Version 10.5. **American Museum of Natural History**, 2008.

POSOKHOV, Y. O.; GOTTLIEB, P. A.; MORALES, M. J.; SACHS, F.; LADOKHIN, A. S. Is lipid bilayer binding a common property of inhibitor cysteine knot ion-channel blockers? **Biophys J**, v. 93, n. 4, p. L20-2, Aug 15 2007. ISSN 0006-3495 (Print) 0006-3495 (Linking).

QUISTAD, G. B.; SKINNER, W. S. Isolation and sequencing of insecticidal peptides from the primitive hunting spider, *Plectreurys tristis* (Simon). **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11098-101, April 15, 1994 1994.

RANSON, H.; N'GUESSAN, R.; LINES, J.; MOIROUX, N.; NKUNI, Z.; CORBEL, V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 2, p. 91-98, 2011. ISSN 1471-4922.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 225-54, Mar 2002. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162-74, Dec 15 2007. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

RODRIGUES, J. H. C. P.; MARI STELA ZEN; NÓBREGA, MOEMA MACIEL DA; TORRES, JOÃO BATISTA. Acidentes com aracnídeos. **Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul**, v. 6, n. (2), p. 91-6, 1986.

RUSSELL, A. B.; HOOD, R. D.; BUI, N. K.; LEROUX, M.; VOLLMER, W.; MOUGOUS, J. D. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 343-347, 2011. ISSN 0028-0836.

SADE, Y. B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 1, p. 170-177, 2011. ISSN 1357-2725.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2001.

SATAKE, H.; VILLEGAS, E.; OSHIRO, N.; TERADA, K.; SHINADA, T.; CORZO, G. Rapid and efficient identification of cysteine-rich peptides by random screening of a venom gland cDNA library from the hexathelid spider *Macrothele gigas*. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 149-156, 2004. ISSN 0041-0101.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. [Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 6, p. 403-15, Nov-Dec 1989. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking).

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONCALVES JUNIOR, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L.; VON EICKSTEDT, V. R.; FRANCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n. 5, p. 546-8, Sep-Oct 1998.

SMITH, J. J.; HILL, J. M.; LITTLE, M. J.; NICHOLSON, G. M.; KING, G. F.; ALEWOOD, P. F. Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 26, p. 10478-10483, June 28, 2011 2011.

SUCHYNA, T. M.; TAPE, S. E.; KOEPPE, R. E., 2ND; ANDERSEN, O. S.; SACHS, F.; GOTTLIEB, P. A. Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 235-40, Jul 8 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).

TAMBOURGI, D. V.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113-1119, 2010. ISSN 0041-0101.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21-32, Jan 2009. ISSN 1638-6183 (Electronic) 0300-9084 (Linking).

TU, W.; CAI, K.; GAO, X.; XIAO, L.; CHEN, R.; SHI, J.; LIU, H.; HOU, X.; WANG, Q.; WANG, H. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 2, p. 169-174, 2009. ISSN 1046-5928.

ULLAH, A.; DE GIUSEPPE, P. O.; MURAKAMI, M. T.; TREVISAN-SILVA, D.; WILLE, A. C.; CHAVES-MOREIRA, D.; GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; SENNF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S.; ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 67, n. Pt 2, p. 234-6, Feb 1 2011. ISSN 1744-3091 (Electronic) 1744-3091 (Linking).

VEIGA, S. S.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUS, J. L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 825-39, Jun 2000a.

VEIGA, S. S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V. L.; DE SOUZA, G. A.; RIBEIRO, A. S.; MANGILI, O. C.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J**, v. 32, n. 7, p. 397-408, Jul 2000b.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; BRAZ, A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 7, p. 843-50, Jul 2001a.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res**, v. 102, n. 3, p. 229-37, May 1 2001b.

VEISEH, M.; GABIKIAN, P.; BAHRAMI, S.-B.; VEISEH, O.; ZHANG, M.; HACKMAN, R. C.; RAVANPAY, A. C.; STROUD, M. R.; KUSUMA, Y.; HANSEN, S. J.; KWOK, D.; MUNOZ, N. M.; SZE, R. W.; GRADY, W. M.; GREENBERG, N. M.; ELLENBOGEN, R. G.; OLSON, J. M. Tumor Paint: A Chlorotoxin: Cy5.5 Bioconjugate for Intraoperative Visualization of Cancer Foci. **Cancer Research**, v. 67, n. 14, p. 6882-6888, July 15, 2007 2007.

VETTER, R. S. Seasonality of brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa*, submitted by the general public: Implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 623-625, 2011. ISSN 0041-0101.

VITT, U. A.; HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. W. Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 681-694, May 1, 2001 2001.

WASSERMAN, G. S. Systemic Loxoscelism Confirmation by Bite-Site Skin Surface ELISA. **Mo Med**, v. 106, n. (6), p. 425-431, 2009.

WERLE, M.; KAFEDJIISKI, K.; KOLMAR, H.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Evaluation and improvement of the properties of the novel cystine-knot microprotein McoEeTI for oral administration. **Int J Pharm**, v. 332, n. 1-2, p. 72-9, Mar 6 2007. ISSN 0378-5173 (Print) 0378-5173 (Linking).

WERLE, M.; KOLMAR, H.; ALBRECHT, R.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Characterisation of the barrier caused by lumenally secreted gastro-intestinal proteolytic enzymes for two novel cystine-knot microproteins. **Amino Acids**, v. 35, n. 1, p. 195-200, Jun 2008. ISSN 1438-2199 (Electronic) 0939-4451 (Linking).

WERLE, M.; SCHMITZ, T.; HUANG, H. L.; WENTZEL, A.; KOLMAR, H.; BERNKOP-SCHNURCH, A. The potential of cystine-knot microproteins as novel pharmacophoric scaffolds in oral peptide drug delivery. **J Drug Target**, v. 14, n. 3, p. 137-46, Apr 2006. ISSN 1061-186X (Print) 1026-7158 (Linking).

YIFENG, L. A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 2, p. 201-210, 2012. ISSN 1046-5928.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 391-400, Feb-Mar 2001.

ZANETTI, V. C.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 13, n. 2, p. 135-48, Mar 2002.

ZLOTKIN, E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. **Annu Rev Entomol**, v. 44, p. 429-55, 1999. ISSN 0066-4170 (Print) 0066-4170 (Linking).